

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：82731

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05761

研究課題名（和文）酵素活性調節ペプチドの探索を目的とした進化分子工学技術の開発

研究課題名（英文）Technology development for evolutionary molecular engineering of peptides that regulate enzyme activity

研究代表者

上野 真吾（Ueno, Shingo）

公益財団法人川崎市産業振興財団（ナノ医療イノベーションセンター）・ナノ医療イノベーションセンター・副
主幹研究員

研究者番号：30594650

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：進化分子工学によるタンパク質開発は、触媒能を評価基準とする酵素や、分子親和性を評価基準とする抗体やペプチドでは一定の成果を上げているが、酵素阻害ペプチドや受容体リガンドペプチド等の酵素活性調節分子は、バイオ医薬品の主要開発対象であるにも関わらず、その酵素活性調節能の評価に基づいた分子進化手法は確立していない。

本研究では、膨大種のペプチド配列の親和性評価で用いられるタンパク質ディスプレイ技術と、100万個の反応容器を搭載したチップでの酵素反応測定技術を組み合わせることで、膨大種のペプチドの酵素活性調節能を直接評価して分子進化を行う実験系の基礎検討を行い、その実現可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酵素阻害ペプチドや受容体リガンドペプチドのような酵素活性調節分子の人工分子進化手法の開発を進めた。これら酵素活性調節分子は、バイオ医薬品の主要開発対象であるにも関わらず、その人工分子進化手法は確立していない。また、生体システムのロバストネスの源である分子ネットワークは、酵素と酵素活性調節分子が共進化した産物である。酵素と酵素活性調節分子の共進化を人工的に再現・解析することは生体システムを理解し利用することに繋がる。このように、酵素活性調節分子に適した人工分子進化手法の可能性を模索し、実験系を構築することは社会的な要請・学術的な問いに応えるものである。

研究成果の概要（英文）：Protein development based on evolutionary molecular engineering has achieved a certain level of success with enzymes based on catalytic activity, and antibodies and peptides based on molecular affinity. However, no method has been established for molecules that regulate enzyme activity, such as enzyme-inhibitor peptides and receptor-ligand peptides, even though they are the main targets of biopharmaceutical development.

In this study, we investigated and demonstrated the feasibility of an experimental system for artificial molecular evolution based on the direct evaluation of the enzyme activity modulating ability of a huge variety of peptides by combining the protein display technology used to evaluate the affinity of a huge variety of peptide sequences with the enzyme reaction measurement technology using a chip equipped with one million reaction vessels.

研究分野：進化分子工学

 キーワード：進化分子工学 分子ディスプレイ エマルジョンPCR 無細胞タンパク質合成 磁気ビーズ ハイスルー
 フットスクリーニング 酵素阻害剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

進化分子工学によるタンパク質の開発は、(A) 触媒活性を評価基準とした酵素の改良、および (B) 分子親和性を評価基準とした標的結合分子としての抗体やペプチドの創製において一定の成果を上げている。しかしながら、両者の複合領域である (A+B) 酵素阻害ペプチド等の探索においては、探索対象であるペプチドが標的に結合した結果生じる、酵素活性の変化を評価基準とすべきところを、技術的な制限から、標的結合能を評価基準として分子探索を行わざるを得ないのが現状である。機能性ペプチドの探索は、膨大種のランダム配列からの探索となるのが通常だが、酵素活性変化の直接観察に必要な反応容器を膨大種のペプチド配列毎に用意することが事実上不可能であったことがその理由である。このように、酵素阻害ペプチドや受容体リガンドペプチドのような酵素活性調節分子は、バイオ医薬品の主要開発対象であるにも関わらず、その分子進化手法は確立していない。このような背景のもと、酵素活性調節分子に適した分子進化手法について検討し、その実験系の構築を目指す本研究を開始した。

2. 研究の目的

酵素活性調節ペプチドの人工進化手法の構築を目的として、膨大種のペプチド配列の個々の酵素活性調節能を直接観察評価してスクリーニングを行う分子進化実験系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 全体構想

膨大種のペプチドとそのアミノ酸配列がコードされた DNA が固定化されたビーズのライブラリーを調製し、チップ上に形成された 100 万個の酵素活性測定用ウェルにペプチド-DNA 固定化ビーズを分配し、分配されたペプチド配列による酵素活性調節能を直接測定し、その測定結果に基づき任意のペプチド-DNA 固定化ビーズをチップ上から回収して遺伝子を解析することによる、酵素活性調節能の直接評価に基づく機能性ペプチド探索実験系を構想した (図 1)。

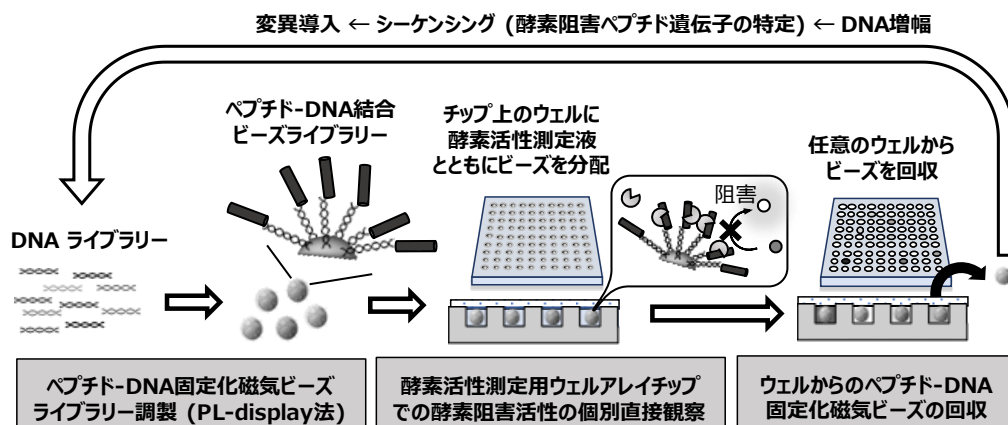


図 1. 酵素活性調節ペプチドの人工分子進化実験系構想図

(2) Peptide-ligase-mediated display (PL-display) 法によるペプチドスクリーニングの検証

磁気ビーズ上にペプチドとそのアミノ酸がコードされた DNA を固定化することによる、独自開発した遺伝子型-表現型対応付け手法 (PL-display 法, 図 2A) によるペプチドスクリーニングの実施可能性評価を行った。6xHis タグ遺伝子の DNA と HA タグ遺伝子の DNA の混合溶液から PL-display 法により 6xHis タグペプチドと HA タグペプチドを提示したビーズのライブラリーを調製し、各々のタグを抗原とする蛍光標識抗体で染色、Fluorescence activated cell sorting (FACS) で選別回収したビーズ上の DNA を増幅・解析することで、使用した抗体に対応する抗原ペプチドの遺伝子が選別されていることを確認する。この結合能評価スクリーニングによって、PL-display 法によるペプチドスクリーニングの実施可能性を評価した。

(3) 酵素活性評価スクリーニング用マイクロウェルアレイチップの作製および運用法の開発

超精密加工機でピラーアレイ金型を切削し、その金型を用いて射出成型することで 10 mm² あたり約 100 万個の反応容器を搭載した樹脂製チップを作成した。その樹脂製チップ表面を酸素プラズマ処理したのち、ウェル外表面をヘキサメチルジシラザン (HMDS) 修飾した。フルオレセイン水溶液および発蛍光性酵素活性測定液をウェル内に導入し、チップ表面をオイルで被覆することで各ウェルを独立させた。各ウェルの蛍光強度および蛍光強度変化を測定することで測定系を評価した。各ウェルに DNA 固定化磁気ビーズを分配しオイル被覆した後、任意のウェルから DNA 固定化磁気ビーズを回収する方法も検討した。

(4) PL-display 法とアレイチップの統合による酵素阻害ペプチド活性測定

PL-display 法により調製したペプチド-DNA 固定化ビーズを、酵素活性測定液とともに、チップ上のマイクロウェルに分配しオイル被覆した。活性測定対象酵素として、プロテインキナーゼ A (PKA)、ビーズ上に提示するペプチドとして天然の PKA 阻害ペプチドである PKA inhibitor (6-22) (PKI) を用いて、PKI 提示ビーズによる PKA 活性阻害を観測し、本実験系による酵素活性調節ペプチドの分子進化手法の可能性について評価した。

4. 研究成果

(1) PL-display 法によるペプチドスクリーニングの検証

6xHis タグ遺伝子の DNA と HA タグ遺伝子の DNA の混合比率 1:1 および 10000:1 の混合溶液から PL-display 法により 6xHis タグペプチドと HA タグペプチドを提示したビーズのライブラリーを調製し、上述のように FACS を用いて各遺伝子を選別した。混合比 1:1 ならびに 10000:1 において、目的遺伝子の濃縮を達成し、本手法で調製したビーズライブラリーを用いた機能性ペプチドのスクリーニングが実施可能であることが示された (図 2B)。

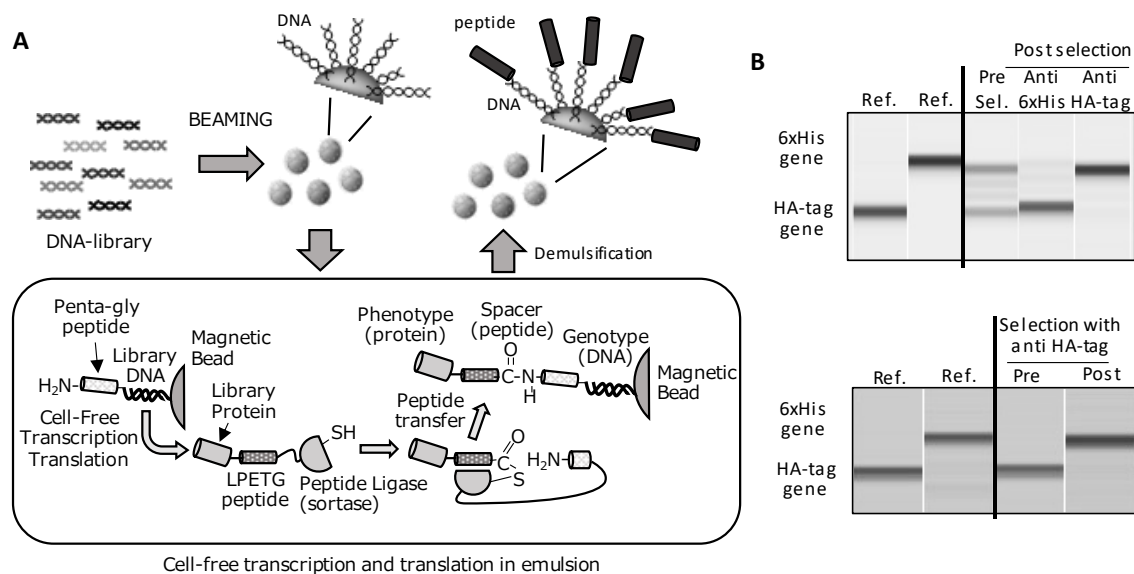


図 2. PL-display 法によるペプチドスクリーニングの検証. (A) PL-display 法による peptide-DNA 固定化ビーズライブラリー調製方法. (B) 遺伝子混合比 1:1 (上段) および 10000:1 (下段) からの遺伝子選別結果. BEAMING: *Nat. Method* **3**, 551-559 (2006).

(2) 酵素活性評価スクリーニング用マイクロウェルアレイチップの作製および運用法の開発

上述した方法で作成した樹脂製チップ上の約 100 万個の反応容器に、マイクロ流路を用いず磁気ビーズと水溶液を封入し、チップ表面をオイルで被覆する手法を開発した (図 3A)。マイクロ流路を用いていないためチップ上面のオイルにキャピラリーを挿入してウェル内のビーズ直上に近接させることが可能である。ビーズ含有ウェル上面近傍に磁場をかけることで、近接させたガラスキャピラリー内にペプチド-DNA 結合磁気ビーズを回収する手法を開発した (図 3B)。フルオレセイン水溶液ならびに発蛍光性 PKA 活性測定液を約 100 万個の反応容器に分配し、蛍光輝度ならびに蛍光輝度変化速度を測定した。その変動係数を算出すると各々 5.5%, 20.9% (n=998962 wells) であった (図 4)。

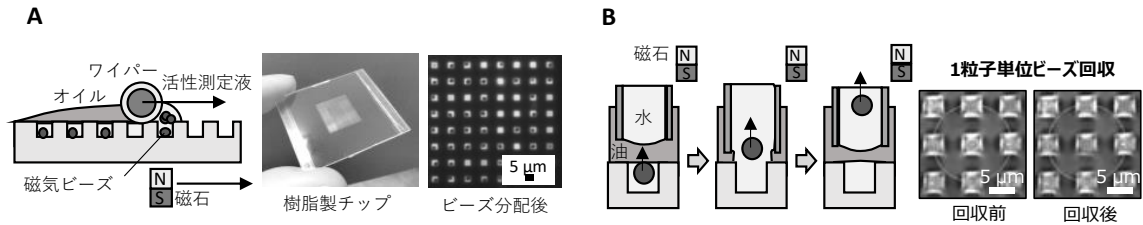


図 3. 酵素活性評価スクリーニング用マイクロウェルアレイチップ. (A) 磁気ビーズと酵素活性測定液の分配方法. (B) マイクロウェルからの磁気ビーズ回収方法.

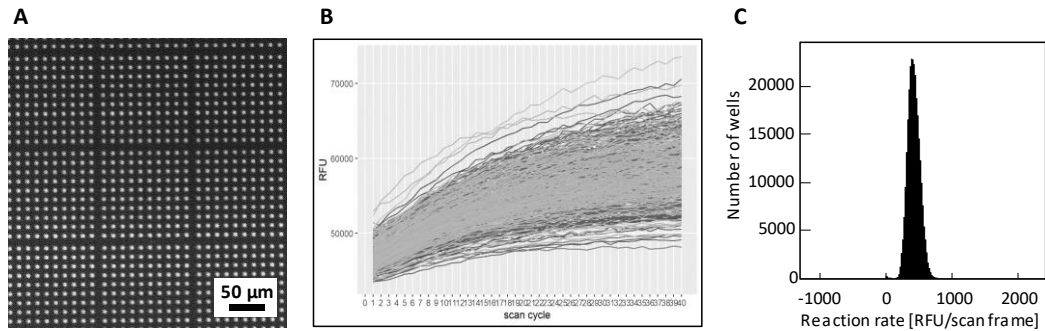


図 4. マイクロウェルアレイチップでの測定結果. (A) フルオレセイン水溶液封入結果. CV 値 5.5% (n=998962 wells). (B) PKA 活性測定液封入ウェルの蛍光強度時間変化. 無作為抽出した 500 ウェルの輝度をプロット (C) PKA 活性測定液封入ウェルの蛍光強度時間変化のヒストグラム. CV 値 20.9% (n=998962 wells)

(3) PL-display 法とアレイチップの統合による酵素阻害ペプチド活性測定

PL-display 法で調製した PKI ペプチド-DNA 固定化ビーズを発蛍光性 PKA 活性測定液に分散した後、チップ上のウェルに分配し PKA 阻害活性を測定した。PKI ペプチドを提示したビーズが分配されたウェルの蛍光強度上昇速度は、PKI ペプチドを提示していないビーズを分配したウェルと比較して低下しており、本手法による PKA 阻害活性の測定が可能であることが示された (図 5)。

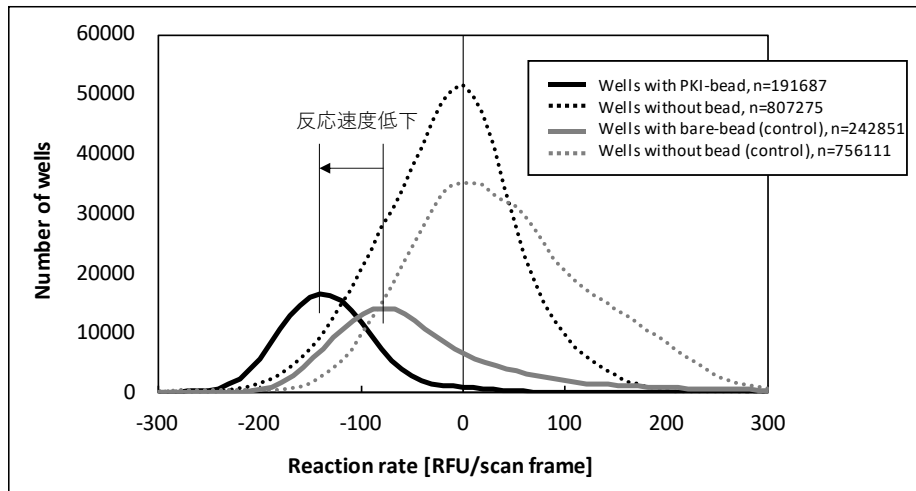


図 5. PKI 提示ビーズ含有 PKA 活性測定液を封入したウェルの蛍光強度時間変化のヒストグラム. ビーズ非含有ウェルの値を基準として表示. 未標識ビーズでの結果をコントロールとして使用.

本研究を通して、 $1 \times 10^{6-7}$ 種規模のペプチドライブラリー中の個々のペプチドによる酵素活性調節能を直接評価してスクリーニングする実験系の構築を進め、その実現可能性が示された。本研究で構築した実験系の最適化を進めることで、酵素阻害ペプチドや受容体リガンドペプチドのような酵素活性調節分子の開発効率の向上に繋がることが期待される。また、本研究の成果は、親和性ペプチドや抗体の分子進化で実用化されているタンパク質ディスプレイ技術を、親和性以外の機能評価に拡張できることも意味しており、酵素活性調節ペプチド以外の、より広範な機能性タンパク質探索技術の開発にも繋がるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上野真吾, 佐藤秀介, 利岡文美, 土屋章一, 一木隆範
2. 発表標題 Peptide ligase display (PL display) for selection of enzyme-related protein by combination with high-density microwell array chip
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野真吾, 佐藤秀介, 土屋章一, 利岡文美, 一木隆範
2. 発表標題 高密度マイクロウェルアレイを用いたタンパク質の定量セレクションシステムの開発
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野真吾, 利岡文美, 一木隆範
2. 発表標題 Model screening of a peptide by individual evaluation and separation using a combination of FACS and peptide ligase display (PL display)
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 磁気ビーズ分配方法	発明者 上野真吾, 土屋章一	権利者 川崎市産業振興財団
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-138140	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 キャピラリー近接検知方法	発明者 上野真吾, 土屋章一	権利者 川崎市産業振興財団
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-138144	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 磁気ビーズ回収方法	発明者 上野真吾、土屋章一	権利者 川崎市産業振興財団
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-138151	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------