

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15096

研究課題名(和文) 要求駆動型合理的蛋白質設計技術が切り拓くナノ分子標的薬の創製

研究課題名(英文) Requirement driven protein design for nano targeting drug production

研究代表者

二井手 哲平(Niide, Teppei)

大阪大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：20802705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、材料認識バイオ分子の認識対象を、低分子医薬品の自己集合体(薬剤結晶)へと展開し、新しい医薬フォーマットとしての「ナノ分子標的薬」の創出を目指した。本研究期間内に、ファージ提示法を用いたナノ材料結合ペプチドの取得とRosettaソフトウェアを用いたナノ材料結合タンパク質の設計に取り組んだ。その結果、薬剤結晶表面に解離定数99.7 nMで結合するペプチド分子の取得に成功した。このペプチド分子をRosettaソフトウェアを用いてがん抗原を認識する抗体様分子に融合したところ、タンパク質の安定性エネルギー値が大きく上昇しないペプチド分子の挿入位置を探索できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬と低分子医薬を化学修飾により組み合わせた抗体-薬物複合体(ADC)は、様々な疾患に対し副作用の無い医薬品として注目を集めているが、抗体の失活や不溶化が原因となり、高い確率で臨床試験以前で脱落してしまう。それに対し我々の目指したナノ分子標的薬は、これまでに無い新しい分子標的薬であり、学術的意義は大きい。さらに、このナノ分子標的薬で用いる人工タンパク質は、分子標的機能と薬剤ナノ粒子表面に結合する二つの機能に限定した低分子量タンパク質であるため、バクテリアで調製でき、薬価を大きく低減させることが期待できる。以上より、将来に向けた新しい創薬モダリティとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：This project expanded the recognition target of material-recognition biomolecules to self-assemblies of small-molecule drugs, aiming to create "nano-targeting drugs" as a new pharmaceutical format. Within the period of this project, we worked on the acquisition of nanomaterial-binding peptides using the phage display technique and the design of nanomaterial-binding proteins using Rosetta software. As a result, we obtained a peptide molecule that binds to the drug crystal surface with a dissociation constant of 99.7 nM and a maximum adsorption capacity of 344.8 pmol/mg. The peptide molecule was fused to a small binding protein that recognizes a cancer antigen on a computer using Rosetta software. The insertion position of the peptide molecule was searched for without a significant increase in the Rosetta energy unit, which indicates the stability energy value of the complete protein.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質工学 計算科学 低分子医薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省が策定した「医薬品産業強化総合戦略」で目標とされている、「海外市場を狙う創薬大国の実現」に向け、低コストで効率的な薬剤開発環境の整備が重要となり、これまでの試行錯誤的な創薬プロセスから、ビッグデータや AI を活用した新しい創薬プロセスが大きな注目を集めている。これには、蓄積している医薬候補物質の再利用が有効であると考えられるが、まずは薬剤フォーマットの特徴を見直し、適切に組み合わせる技術構築が必要である。

高い標的特異性を持つ抗体医薬と豊富な標的分子・多彩な作用機序を備える低分子医薬を化学修飾により組み合わせた抗体-薬物複合体(ADC)は、様々な疾患に対し副作用の無い医薬品として期待されている。しかし、大部分の低分子薬物は水に不溶であることや、抗体への部位特異的な薬剤修飾が困難なことから、抗体の失活や不溶化が生じてしまい、高い確率で ADC 候補医薬は臨床試験以前で脱落してしまう。たとえ、治療効果が認められても、抗体は分子量 15 万と巨大なため、高コストな動物細胞で生産する必要があり、高額な医療費を招く。これら背景から、ADC に代わる新しい創薬モダリティが望まれている。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、有機ナノ結晶に結合するペプチドを取得し、貧溶媒晶析法によりペプチド融合蛋白質と有機ナノ結晶から成る複合材料の調製に成功してきた。そこで本研究課題では、薬剤有機ナノ結晶の表面を認識するペプチド分子を介して標的指向性を持つバイオ分子を固定化することで、薬剤有機ナノ結晶を患部特異的に送達可能な新しい薬剤送達手法の開発を目指した。特に本研究期間では、ファージ提示法による有機ナノ結晶認識ペプチドの取得と、Rosetta による抗体様分子への有機ナノ結晶認識ペプチドの移植を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファージ提示法による薬剤ナノ結晶認識ペプチドの取得

12 残基のランダムなペプチドを pIII タンパク質に提示した M13 ファージを用いて有機ナノ結晶表面に結合するペプチド分子を取得する。有機ナノ結晶は難水溶性医薬分子を用い、ファージ提示法での操作に適した直径 100 μ m 程度の抗癌剤結晶を再結晶法により作製する。

(2) 有機材料結合性タンパク質の設計

癌細胞に過剰発現する上皮成長因子(EGFR)をはじめ受容体型チロシンキナーゼ(HER2, 3, 4)などの癌抗原に結合する抗体群から、薬効と親和性を元に CDR の配列と構造情報を抽出する。次に、Rosetta ソフトウェアにて、大腸菌で発現可能かつ標的特異性を持つナノ界面接合タンパク質群を設計する。(1)のファージ提示法で取得したペプチドと抽出した抗体 CDR を Rosetta ソフトウェア内の機能断片組立ツールで融合する。

4. 研究成果

(1) ファージ提示法による薬剤ナノ結晶認識ペプチドの取得

10¹¹ pfu/mL (pfu: plaque forming unit) のファージライブラリーを薬剤粒子と接触させ、Tween20 を含む緩衝液で洗浄後、溶離液で薬剤粒子と結合ファージを解離させる操作を 4 サイクル繰り返した。各サイクルごとの溶出ファージ数 (Output) を投入ファージ数 (Input) で割ったグラフを図 1 に示す。これより、サイクルを重ねるごとに Output/Input の値が増加していることがわかる。この結果は、投入したファージのうち、薬剤粒子に結合を示すファージが増加していることを示しており、サイクルが進むごとに薬剤粒子に結合能を持つペプチドが増加していることを示している。

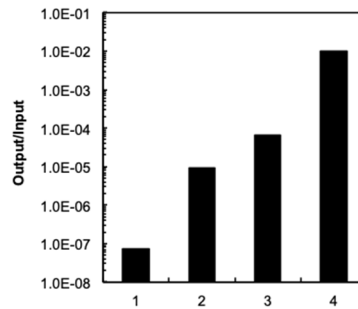


図 1 4 サイクルの各バイオパニングにおける投入ファージ量に対する溶出ファージ量の割合

4 サイクルのバイオパニング後、結合能を示すペプチドを持つファージクローンの増加が認められ、55 個のクローンの持つペプチドを解析したところ、合計 7 種のペプチドが同定された。同定されたペプチド配列が薬剤粒子に対し結合能を保持しているかを飽和吸着実験により評価した。同定された 7 種のペプチド配列のうち、濃縮された順に上位 4 種類 (P1、P2、P3、P4) を Fmoc 固相合成により調製した。この時、ペプチドの配列の C 末端にフルオレセイン蛍光基をグリシン-セリンのリンカー配列を介して付加した。フルオレセインでラベル化されたペプチドを薬剤粒子と混合後、遠心分離し、上清の蛍光強度を蛍光光度計により測定することで、吸着したペプチド量を算出した。吸着実験の結果、評価に用いた 4 種類のペプチド全てにおいて吸着が確認された。なかでも P4 が強い結合を示し、Langmuir の吸着等温式による解析の結果、解離定数 99.7 nM、最大吸着量 344.8 pmol/mg で薬剤粒子に結合することが分かった。

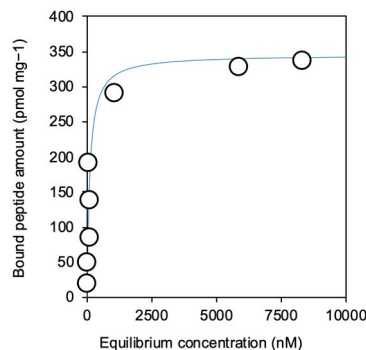


図 2 薬剤粒子に対する P4 ペプチドの飽和吸着曲線

(2) 有機材料結合性タンパク質の設計

抗体の結合能を必要最小構造化を目指し、抗体の相補性決定領域 (CDR) を別のタンパク質

のループ構造に移植することを試みた。フィブロネクチン III 型ドメイン等のサイズが小さくかつ、ループ構造を持つ複数のタンパク質を移植先タンパク質として用いた。EGFR、HER2 を抗原とする抗体から CDR のアミノ酸配列の抽出を実施した。この時、抗原と抗体の共結晶構造が明らかとなっているものを選択した。まず、抗体の全アミノ酸配列のうち、CDR の位置を予測プログラムにより同定した。抗体と抗原の共結晶構造から強い結合が示唆される CDR を一つ抽出し、移植先タンパク質のループ部分に挿入した。実行は Rosetta の Anchored Design プロトコルを用いた。移植先のアミノ酸の挿入位置を一アミノ酸残基ずつずらし、最も Rosetta energy unit (REU) が低下する位置を最適挿入位置とした。次に、挿入したループ以外のループ構造をランダム化し、より抗原に強く結合するように設計した。以上の操作により REU 値の低下が見られ、複合体形成により構造が安定化することが示唆された。これは設計したタンパク質が結合能を持つことと同義である。次に、移植したループ構造と反対側に存在するループ構造または、末端配列に対し、薬剤ナノ結晶認識ペプチドの挿入を試みた。ループへの挿入の場合は Anchored Design プロトコルを用いた。設計後、REU 値を評価することで実際に取りうる構造かを評価した。今後、大腸菌発現系により調製し、その機能を評価する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai Ryutaro, Toya Yoshihiro, Miyoshi Kenta, Murakami Manami, Niide Teppei, Horinouchi Takaaki, Maeda Tomoya, Shibai Atsushi, Furusawa Chikara, Shimizu Hiroshi	4. 巻 119
2. 論文標題 Acceleration of target production in co culture by enhancing intermediate consumption through adaptive laboratory evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 936 ~ 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.28007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 梅津光央、中澤光、二井手哲平	4. 巻 39
2. 論文標題 材料表面を認識するペプチド・タンパク質から発想するハイブリッドナノアセンブリ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 27-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉木創、二井手哲平、戸谷吉博、清水浩
2. 発表標題 機械学習を活用したリンゴ酸酵素の補酵素特異性変換
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮脇佳汰、二井手哲平、戸谷吉博、清水浩
2. 発表標題 補酵素特異性改変を目指した合理的酵素設計プロセスの開発
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二井手哲平
2. 発表標題 タンパク質の構造保存性と合理的機能設計
3. 学会等名 酵素工学研究会 第87回講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学情報科学研究科清水研究室 <http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/hp/index.html>

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		
米国	ノースカロライナ大学チャペル ヒル校		