

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21284

研究課題名（和文）微生物由来の極性中分子ペプチドに着目した創薬モダリティの開拓

研究課題名（英文）New drug modalities with hydrophilic mid-size peptides from microorganisms

研究代表者

濱野 吉十（Hamano, Yoshimitsu）

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：50372834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：極性中分子ペプチドの多くは、細胞膜を透過しないため動物細胞への生理活性を指標とした従来法では探索が難しい。そこで本研究では、極性中分子ペプチドをポリカチオン修飾し細胞膜透過性を付与することで新しい生理活性が得られるか検証した。既存の極性中分子ペプチドをポリカチオン修飾したところ、実際にこれらペプチド化合物が動物細胞内に送達し細胞毒性を示すことを明らかにした。現在、放線菌由来の極性中分子ペプチドをポリカチオン修飾し新規活性が検出できるか検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は多種多様な中分子ペプチドを生産するが、分子量1,000を超える中分子ペプチドの多くは細胞膜を透過しないため、従来の生理活性を指標とした創薬シード探索では十分に探索しきれていない。特に、極性中分子ペプチドは細胞膜を全く透過しないため、未開拓な創薬資源と言える。本研究では、これら中分子ペプチドをポリカチオン修飾することで細胞膜透過性を改善させ、実際に新しい生理活性を見出せることを示した最初の成功例である。さらに、細胞膜透過する極性中分子ペプチドの分子標的を同定できれば、抗体医薬に出遅れた日本において、極性中分子ペプチドを基盤とした創薬モダリティを世界に先駆けて開拓できる。

研究成果の概要（英文）：Many polar peptides do not permeate cell membranes, making it difficult to explore them by traditional methods based on cytotoxicity in animal cells. In this study, we examined whether polycationic modifications of polar peptides could obtain new biological activities such as cytotoxicities due to their cellular internalizations. We found that the polycationic modifications of polar peptides indeed resulted in their intracellular deliveries and cytotoxicities. We are currently investigating the possibility of the polycationic modification of polar peptides from actinomycetes to detect novel activities.

研究分野：応用微生物学

キーワード：中分子創薬 ペプチド 細胞膜透過性

1. 研究開始当初の背景

微生物由来の低分子化合物は、20世紀創薬化学の中心化合物であり主要な創薬資源であった。しかし、近年のバイオテクノロジー技術の革新によりその主役の座は抗体医薬などのバイオ医薬にパラダイムシフトしている。ただし、バイオ医薬には弱点もあり、コストが非常に高い、タンパク質であるため経口投与ができない、など技術的な課題は今なお存在する。さらに、高分子であることから基本的に細胞内に入らないため、バイオ医薬の標的は細胞表面の受容体などに限定され、治療可能な疾患も限定的である。

こうした現状を打ち破る新たな手法として、現在、「中分子医薬」が注目されている。しかし、中分子医薬にも課題は存在し、その最大の課題は「低い細胞膜透過性」と「高い製造コスト」である。中分子ペプチドは、現在様々な革新的な技術で創薬デザインされているが、最終的には固相有機合成に頼るしかなく、その高コストが実用化への大きな障壁となっている。そこで我々は、これら二つの重要な課題を解決するために、微生物培養で得られる「低コストな天然の極性中分子ペプチド」と「微生物由来の究極的低コスト細胞膜透過性ペプチド(CPP)」を利用した新しい中分子ペプチドの創製に着目した。さらに、極性中分子ペプチドが結合する細胞内の新しい分子標的を同定できれば、抗体医薬に出遅れた日本において、極性中分子ペプチドを基盤とした創薬モダリティを世界に先駆けて開拓できると考えている。

2. 研究の目的

近年の微生物ゲノム解析によって、微生物は予想以上に多種多様な中分子ペプチド(分子量1,000~3,000程度)を生産する可能性が示された。しかし、分子量1,000を超える中分子ペプチドの多くは細胞膜を透過しないため、従来の生理活性を指標とした創薬シード探索(薬となる候補化合物の探索)では十分に探索しきれていない。特に、極性の高い中分子ペプチド(極性中分子ペプチド)は細胞膜を全く透過しないため、未開拓な創薬資源と言える。すなわち、極性中分子ペプチドの細胞膜透過性を網羅的に改善する実用的な技術を開発できれば、新しいタイプの創薬シードを獲得できるはずである。

そこで本研究において、最近我々が開発した「化合物の細胞膜透過性を改善する実用的なポリカチオン修飾技術」を活用し、生理活性を示す極性中分子ペプチドを微生物から探索する技術の確立を行った。そして、抗体医薬に出遅れた日本において、極性中分子ペプチドに着目した創薬モダリティを世界に先駆けて開拓することを目指した(図1)。

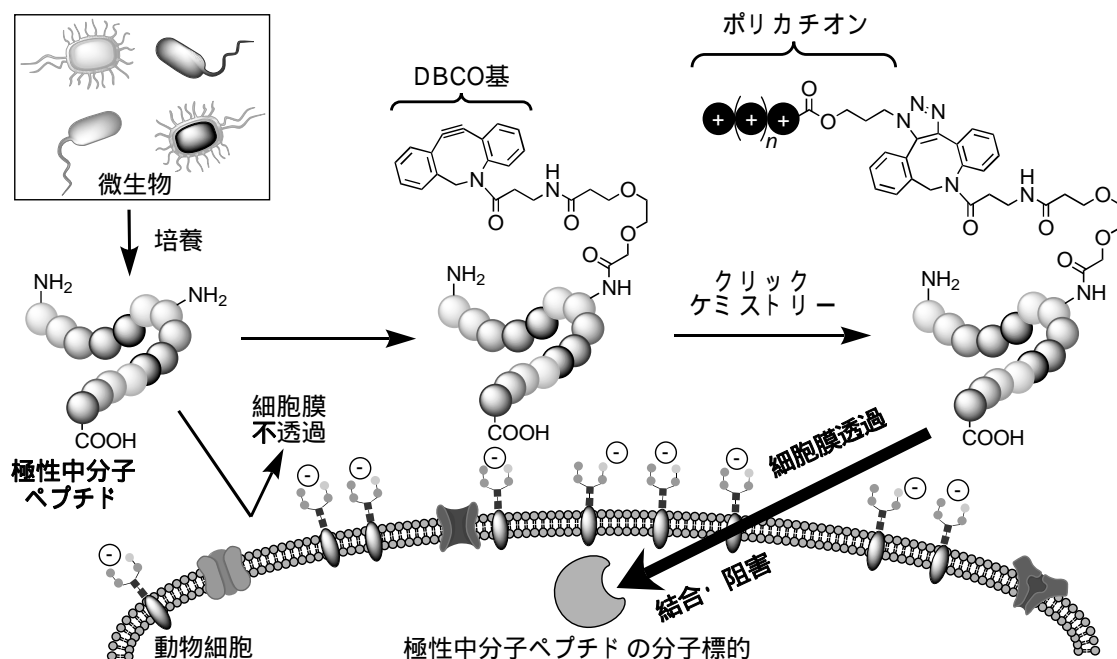


図1

3. 研究の方法

塩基性アミノ酸を主成分とするポリカチオン性ペプチドは、分子量が1,000を超えるにも関わらず、優れた細胞膜透過性を示すことから細胞膜透過性ペプチド(CPP)と呼ばれる。極性中分子ペプチドをCPPでポリカチオン修飾できれば、その細胞膜透過性を改善させることができる。しかし、ポリカチオン修飾するためのCPPには反応基(アジド基など)を有機化学的に導入する必要があり、また、CPPの合成も固相有機合成法に頼るしかない。その高額な製造コストは、この種の研究における大きな障壁であったが、我々は最近、放線菌由来の天然ポリカチオン化合物

物である α -ポリ-L-リジン (α -PL) および、リジンオリゴペプチド[oligo(α -Lys)]が既存の CPP に代わる究極的低コスト CPP として利用できることを見出した(国際特許出願 PCT/JP2018/31153)。さらに、微生物培養法あるいは酵素合成法により、カルボキシ末端にアジド基などの反応基を導入することも可能である。すなわち、 α -PL-PEG-azide あるいは oligo(α -Lys)-PEG-azide を用いて極性中分子ペプチドを低コストにポリカチオン修飾する基本技術が整っている。

そこで本研究では、2 年計画にて下記の 3 つ研究項目を実施することで、極性中分子ペプチドを網羅的にポリカチオン修飾し細胞膜透過性を付与する基盤技術の構築を行った。

研究項目 A: 微生物由来極性中分子ペプチドの選択分離濃縮法の確立

研究項目 B: 極性中分子ペプチドの網羅的ポリカチオン修飾と生理活性評価

研究項目 C: 生理活性を有する極性中分子ペプチドおよびその分子標的タンパク質の同定

4. 研究成果

研究項目 A: 微生物由来極性中分子ペプチドの選択分離濃縮法の確立

既存中分子ペプチド化合物をモデルとして、イオン交換樹脂とゲル濾過樹脂による極性中分子ペプチドの選択分離法を検討した。その結果、Sephadex 樹脂を用いることで、サンプルから低分子化合物を除去し中分子ペプチド化合物をある程度選択的に分離できることを見出した。さらに、陽イオン交換樹脂を用いることで極性の中分子ペプチドを選択的に濃縮できることが判明した。

本研究項目ではさらに、放線菌から網羅的に中分子ペプチドをスクリーニングするために、放線菌の選択分離と同属種放線菌の重複を避ける手法を確立した。20 種の同定済みの放線菌をモデルとして、培養で得られた菌体を有機溶媒で抽出し、その抽出液の MALDI-TOF-MS 分析を行った。各菌株の特徴的な MS スペクトルをもとに、属種分類とインハウスデータベースの構築を行うとともに、菌体の調製方法や MALDI-TOF-MS 分析の最適条件を確立した。この条件をもとに、約 200 株の放線菌株についてインハウスデータベースを作成することができ、現在、これら実験手法を用いて、放線菌由来極性中分子ペプチドの網羅的な選択分離を行っている。

研究項目 B: 極性中分子ペプチドの網羅的ポリカチオン修飾と生理活性評価

中分子ペプチドを α -PL-PEG-azide あるいは oligo(α -Lys)-PEG-azide でポリカチオン修飾するためには、中分子ペプチドに DBCO 基を導入し Huisgen 環化反応を利用する。そこで、既存の極性中分子ペプチドをモデルとして、これら化合物へ DBCO 基を導入しポリカチオン修飾する実験手法を確立した(図 2)。現在、本手法を用いて、研究項目 A で得られた放線菌由来極性中分子ペプチドの網羅的なポリカチオン修飾を実施している。

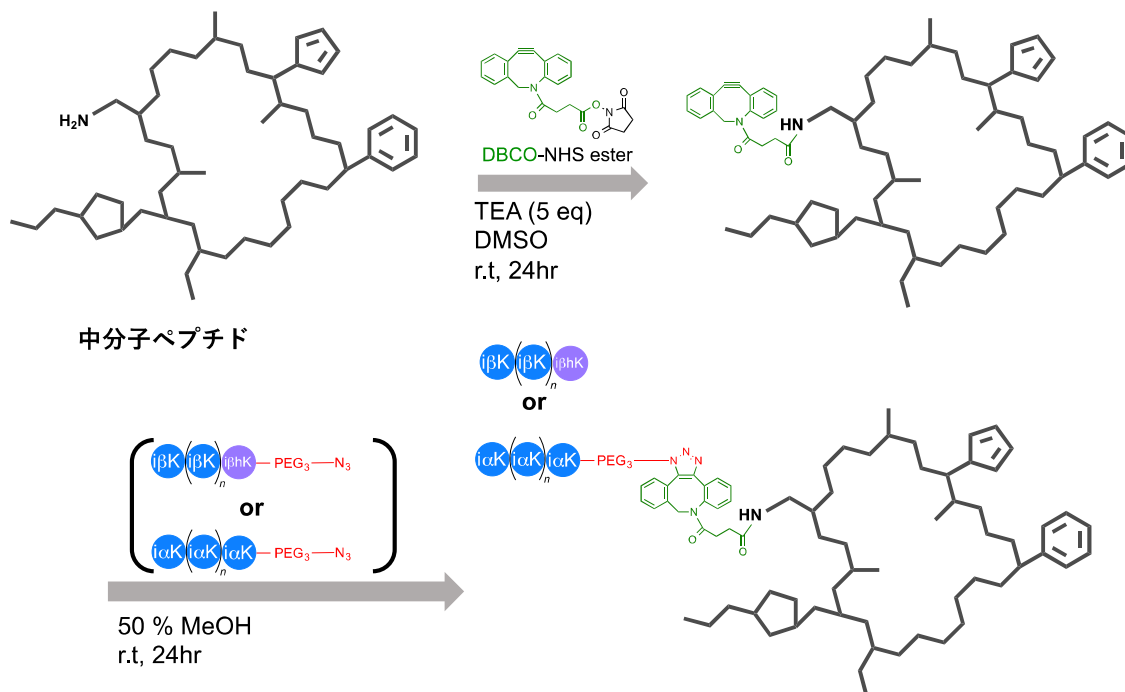


図 2

研究項目 C: 生理活性を有する極性中分子ペプチドおよびその分子標的タンパク質の同定

ポリカチオン修飾した中分子ペプチドの動物細胞における細胞毒性を評価したところ、ポリ

カチオン修飾依存的に細胞毒性を示すことを明らかにした (図3)。

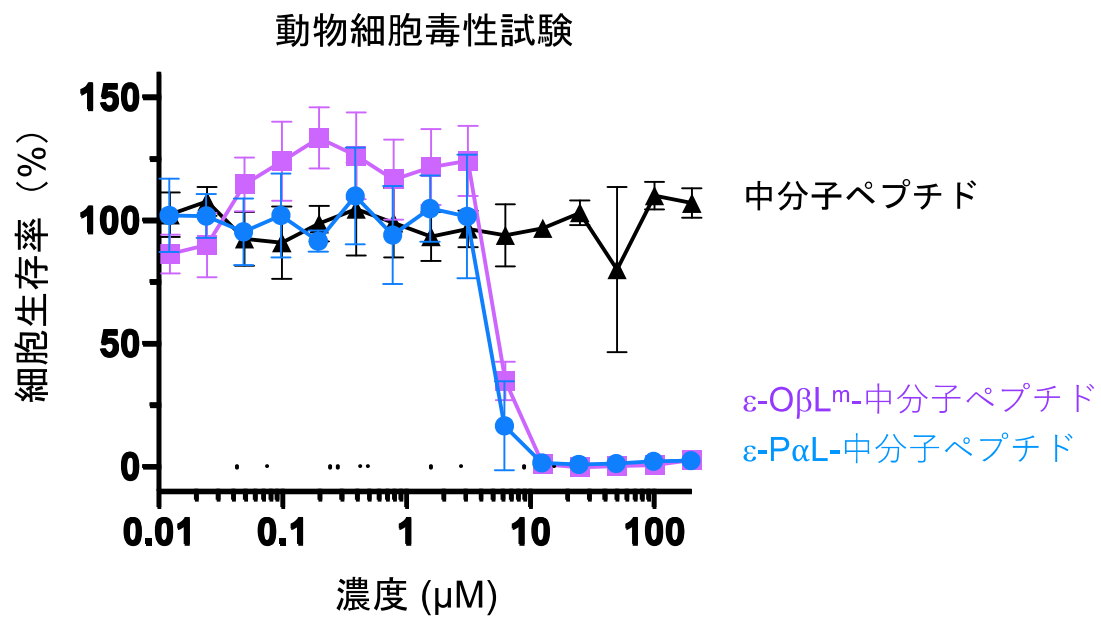


図3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小倉知也, 鈴木海渡, 武内大和, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 ポリカチオンイソペプチド修飾した抗生物質ダプトマイシンの細胞膜透過性と生理活性の評価
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木海渡, 小倉知也, 武内大和, 丸山千登勢, 濱野吉十
2. 発表標題 ポリカチオンイソペプチド修飾した抗生物質バシトラシンの細胞膜透過性と生理活性の評価
3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	丸山 千登勢 (Maruyama Chitose) (20452120)	福井県立大学・生物資源学部・准教授 (23401)	

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
---------	---------