

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21492

研究課題名(和文) 拡張したランダムペプチド集団から効率的に薬物リードを取得する方法の開発

研究課題名(英文) Development of an efficient strategy for obtaining drug leads from expanded random peptide libraries

研究代表者

小出 隆規 (Koide, Takaki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

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)：我々はL体D体アミノ酸が混在したコンビナトリアルランダムペプチドライブラリ(OB2ⁿPライブラリ)から、高い生体内安定性が期待できる医薬品リード化合物の候補を探す手法を考案した。本法ではモノクローナル抗体を標的とした成功例を見たものの、これを一般化するには検出感度が足りていない。そこで、種々のシグナル増幅手法との組み合わせを検討した。求める要件までは達しなかったものの、検出感度は向上し、さらなる高感度化を妨げる原因を明らかにして改善のための示唆を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然のペプチドの大部分はL体のホモキラルである。またその鏡像体であるD体ホモキラルなペプチドの取得についてはmirror image screeningが報告され応用されている。本研究は、上記既存の方法では探索することが不可能な、DL-アミノ酸が混在するヘテロキラルなペプチド集団から医薬品のリードを探索することを企図したものであり、実験の規模を維持したまま探索できるケミカルスペースを大規模に拡大できる戦略である。本研究の遂行により、検出感度向上における技術的問題点が明らかになり、社会実装に向けて、今後改善すべき点とその方策に重要な示唆を得た。

研究成果の概要(英文)：We have developed a strategy to search for drug lead compound candidates with high in vivo stability from combinatorial random peptide libraries (OB2ⁿP libraries) containing a mixture of L- and D-amino acids. Although we have seen success in targeting an monoclonal antibody, the detection sensitivity is not sufficient to generalize this method. Therefore, we examined combinations with various signal amplification methods. Though the detection sensitivity was not up to our requirements, it was improved, and we identified the causes that prevented further increase in sensitivity and provided suggestions for improvement.

研究分野：タンパク質・ペプチド科学

キーワード：ペプチド スクリーニング モノクローナル抗体 ライブラリ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ランダムペプチドライブラリからのスクリーニングは、医薬品リード探索における戦略の一つである。Split-and-mix 法で固相担体ビーズ上に構築される one-bead-one-peptide (OBOP) ライブラリは、非天然アミノ酸や非ペプチドを導入できる拡張性を有している。しかしながら、L-アミノ酸のみで構築されるものがほとんどであり、取得されたペプチドはプロテアーゼによる易分解性のためにそのままでは医薬品リードとはなり難かった。

我々は L/D-アミノ酸の等量混合物を縮合に用いる split-and-mix 法により、一つのビーズ上に、アミノ酸配列は等しいが、絶対構造が異なる 2^n 種類 (n はアミノ酸残基数) のジアステレオマーを提示する one-bead- 2^n -peptides (OB 2^n P) ライブラリを構築した^[1]。この方法により、OBOP ライブラリより 2^n 倍の多様性を持つライブラリを、従来と同じ実験規模で構築できた。

OB 2^n P ライブラリ (アミノ酸配列決定) を用い、標的モノクローナル抗体 (mAb) に標識した alkaline phosphatase (AP) による発色の生成 (以降「従来法」と呼ぶ) とマルチペプチド合成 (絶対構造決定) を組み合わせることで、標的 mAb のヘテロキラルな mimotope (エピトープ模倣体) を 5 残基の OB 2^n P ライブラリから 2 週間程度で得ることができた。

2. 研究の目的

これまでに、5 残基の OB 2^n P ライブラリから抗体の mimotope を取得できた一例を報告した^[1]。だが、OB 2^n P ライブラリはアミノ酸残基数 (n) の増加に伴ってジアステレオマー 1 種あたりの提示量が 2 のべき乗で減少し、検出シグナルが小さくなる。抗体のエピトープは一般的に 9 残基程度であることを考えると、OB 2^n P ライブラリからの探索法を一般化するには、1 ビーズあたりに提示される総ペプチド量 (約 100 pmol) の $1/2^n$ の単一ジアステレオマーを検出できるように大幅な (最低でも 2^4 倍以上) 感度向上が必要である。本研究では従来法に増幅系を組み込むことで、検出感度の高感度化を目指した。ここでは標的を mAb に絞り、系の確立を目指した。

3. 研究の方法

まずは従来法における検出限界を調査し、シグナル検出の高感度化の必要性を確認した。シグナル検出の高感度化のため、抗原-抗体反応の検出シグナルの増幅に用いられている rolling circle amplification (RCA) streptavidin biotinylated protein network (SBPN) immunosignal hybridization chain reaction (isHCR) を従来法に組み込むことを検討した。

4. 研究成果

(1) 従来法での検出限界の調査

抗 μ -endorphin mAb (clone:3-E7) に対し、そのエピトープである Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGLF) の提示量を変化させたビーズを用いて検出限界を調査した。ビーズの染色が確認できたのは 3-6 pmol ($n=4-5$ に対応) までの提示量であり、従来法では必要な感度要件を満足できなかった (図 1)。

検出感度の向上のためにライブラリデザインに長鎖リンカー入りの分岐構造を導入して総ペプチド提示量を増やすことを検討した。

1 分岐 (ペプチド提示量 2 倍) までは感度向上が観察されたものの、2 分岐 (ペプチド提示量 4 倍) 導入した時点で分岐なしのものよりも検出感度が低下した。

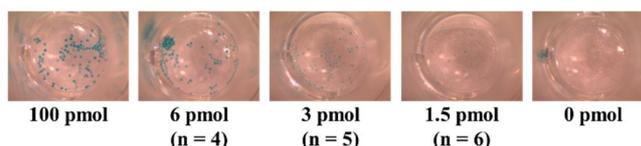


図1 従来法での検出限界の調査

(2) RCA を用いたシグナル増幅法

RCA は一本鎖 DNA を、それと相補的な配列を有する環状 DNA を用いて酵素的に伸長する方法である^[2]。一本鎖 DNA を標識した前述の抗 μ -endorphin mAb を用い、RCA による検出感度を評価・検討した。Biotin 標識 dUTP を用いてペプチド-mAb 複合体あたりの情報基を増幅し、streptavidin-alkaline phosphatase (SA-AP) と発色基質を用いてビーズを染色した。反応条件について検討し、YGGFL 提示ビーズを抗体特異的に染色できた(図 2)。また、蛍光ヌクレオチドを用いた検出法にも対応できることを明らかにした。しかし、ランダムペプチドビーズ使用時に抗体非依存的な染色が起こることが明らかとなった。現時点でこれを効果的に抑制する条件は見つかっていない。

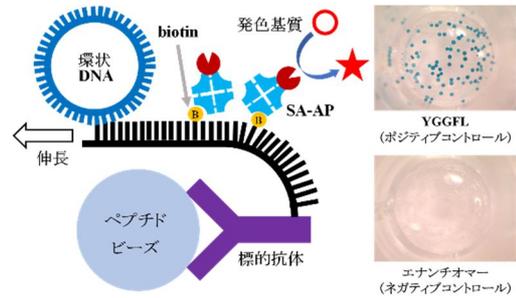


図2 RCA法の模式図とペプチドビーズの染色

(3) isHCR を用いたシグナル増幅法

isHCR では、biotin 標識抗体に対して streptavidin (SA) と 5' biotin 標識一本鎖 DNA (HCR initiator) を加え、二種類の内部 biotin 標識一本鎖 DNA (HCR amplifiers) を分子間 hybridization させる^[3]。Biotin 標識した同 mAb を用い、SA-AP と発色基質で YGGFL 提示ビーズを抗体特異的に染色できた(図 3)。isHCR 法では抗体非依存的な染色は見られなかったが、検出感度の有意な向上は観察されなかった。

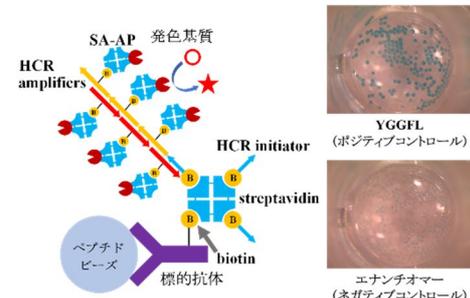


図3 isHCR法の模式図とペプチドビーズの染色

(4) SBPN を用いたシグナル増幅法

SBPN では、biotin 標識抗体に対して SA と多価ビオチン化タンパク質を交互に添加することによる超分子形成を行う^[4]。Biotin 標識した同 mAb を用い、SA-AP と発色基質で YGGFL 提示ビーズを抗体特異的に染色できた(図 4)。抗体非依存的なシグナルは見えなかったものの、検出感度については従来法と比べて有意な向上は観察されなかった。

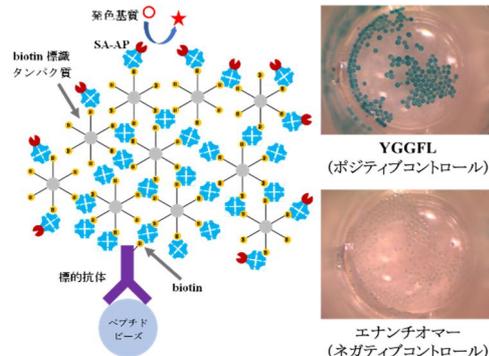


図4 SBPN法の模式図とペプチドビーズの染色

(5) UV クロスリンクを用いたシグナル増幅法

isHCR 法と SBPN 法にて、biotin 標識 mAb 添加後に UV 照射によるクロスリンクを行うことを検討した。SBPN 法について、0.75-1.5 pmol ($n=6-7$ に対応)の提示量を検出することができた。最適条件ははまだ定まっていないが、クロスリンクは感度向上における有効な手段である。

(6) アミノ酸配列解析

固相担体ビーズ上のペプチド配列解析について、Edman 分解法だけでなく、MALDI-TOF 型質量分析計によるタンデム質量分析でも実施できることを確認した。また、固相担体ビーズとペプチド間の cleavable リンカー未導入でも、イオン化を促進するための N 末端化学修飾により、MALDI-TOF 型質量分析計でペプチド配列解析を実施できることを確認した。

<参考文献>

- [1] H. Udagawa et al. (2019) ChemBioChem, 20, 2070-2073.
- [2] B. Schweitzer et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 10113-10119.
- [3] L. Rui et al. (2018) Nat Methods, 15, 275-278.
- [4] W. C. Yu et al. (2013) Chem Commun (Camb), 49, 2397-2399.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	増田 亮 (Masuda Ryo) (90632159)	早稲田大学・理工学術院・次席研究員(研究院講師) (32689)	

	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
研究協力者	米田 崇人 (Yoneda Takato)	早稲田大学・先進理工学研究科 (32689)	

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