

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590544

研究課題名(和文)大腸菌発現系を用いたペプチド性分子認識診断薬の創製法

研究課題名(英文) Hishot display - a new combinatorial display for obtaining target-recognizing peptides

研究代表者

辻 祥太郎 (Tsuji, Shoutaro)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・がん治療学部・主任研究員

研究者番号：30285192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、動物を使用せずに大腸菌とプラスミドライブラリーを用いて遺伝子工学的に標的認識ペプチドを得る「Hishot法」を開発した。抗体フラグメントを利用したHishot法により標的に結合する複数のペプチドクローンが得られ、可溶性の精製蛋白質として実験に使用することができた。Hishot法は、分子認識薬を得るための有用なディスプレイ法の一つとして用いることが可能である。

研究成果の概要(英文)：Display technologies are procedures used for isolating target-recognizing peptides without using immunized animals. In this study, we describe a new display method, named Hishot display, that uses Escherichia coli and an expression plasmid to isolate target-recognizing peptides. This display method is based on the formation, in bacteria, of complexes between a polyhistidine (His)-tagged peptide including random sequences and the peptide-encoding mRNA including an RNA aptamer against the His-tag. Using this display method and a synthetic library of surrogate single-chain variable fragments consisting of VpreB and Ig heavy-chain variable domains, it was possible to isolate clones that could specifically recognize a particular target. The obtained clones could be purified as soluble protein produced by E. coli. The Hishot display will be a useful method to add to the repertoire of display technologies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学 生物・生体工学 分子認識 バイオテクノロジー 遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

標的分子を特異的に認識する分子（以下、分子認識薬）は、診断、検査、治療の場で幅広く用いられ、疾患や病態を分子的に解析する上で欠かせないツールである。なかでも単クローン抗体は、標的に対する特異性や親和性、また抗体自体の安定性とコスト面で優れており、検出試薬や治療薬としてもっとも一般的な存在である。しかし、一般的な動物への免疫法では、低分子や種間で高度に保存されている抗原に対する抗体の作製は困難で、標的分子に対する抗体が常に準備できるとは限らない。

抗体を得にくい分子に対して、動物を使用せずに「人工的」に分子認識薬を作製する方法が考案されている。ペプチド性分子認識薬では、ファージディスプレイ法、リボソーム法、mRNA ディスプレイ法などが挙げられる。また、核酸性分子認識薬（核酸アプタマー）では SELEX 法がある。いずれの方法も、人工的な選択により、抗体を得ることが出来ない分子に対しても結合する分子認識薬を分離できる。しかし、これらの手法は単クローン抗体作製法に替わるほどは普及していない。その理由として、特殊な試薬や装置の使用、作製の効率やコスト、得られる分子認識薬の安定性や親和性などの問題点が挙げられる。また、よく実施されているファージディスプレイ法や SELEX 法でさえ、技術的な面で細かなノウハウを必要とし、だれでも簡単に実施可能というわけにいかないのが現状である。

我々はこれまでの研究で His タグに対して数 pM オーダーの親和性（抗体の 1000 倍）を有する抗 His タグ RNA アプタマー（shot47）を樹立した。Shot47 は大腸菌抽出液中でも His タグ付加蛋白質と安定な複合体を形成し得る。そこで我々は、shot47 を利用した新しい分子認識薬の作製法が確立できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

Shot47 は His タグに対し高い親和性を示し、結合後の解離がほとんど見られず、大腸菌抽出液中でも His タグ付加蛋白質と安定な複合体を形成する。そこで我々は、shot47 配列をもつ His タグ付加蛋白質の mRNA と、その翻訳物である His タグ付加蛋白質は、大腸菌内でも強固で安定な複合体を形成できると考え、これを利用した新しい分子認識薬の作製法（Hishot 法）が確立できるのではないかと考えた。

Hishot 法は以下のような原理に基づく（図 1 参照）。His タグが付加された任意のペプチド配列をコードする遺伝子を合成し、mRNA の非翻訳領域に shot47 の配列を挿入した大腸菌発現ベクターに組み込む。このプラスミドを大腸菌に導入し、ペプチドの発現を誘導する。一つの大腸菌には一つのプラスミドク

ローンが導入されるため、各々の大腸菌内では mRNA と翻訳されたペプチド配列は一つのクローンに由来している。大腸菌内では「ペプチドの His タグ」と「mRNA の shot47」が結合し、His タグペプチドと shot47 タグ mRNA の複合体が安定に形成される。大腸菌を非変性下で溶菌し、溶菌液を標的分子と混合した後、標的分子と結合した複合体を分離する。分離された複合体より mRNA を精製し、RT-PCR により増幅して、得られた cDNA を大腸菌発現ベクターに再度組み込む。このサイクルを繰り返すことで標的分子と特異的に結合するペプチド配列を濃縮し、最終的にクローニングを行って同定する。任意のペプチド配列部分の遺伝子の一部をランダム合成することで、ランダムペプチドライブラリーを作製することができ、ペプチド、およびランダム領域の長さは原理的には制限がない。

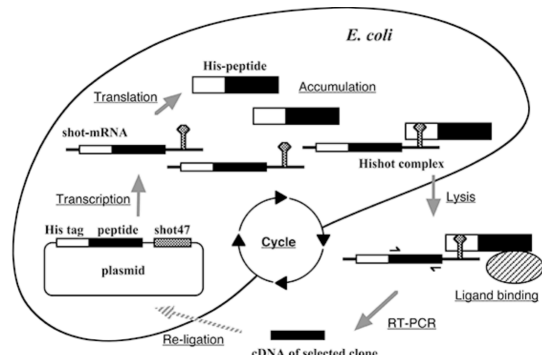


図 1 Hishot 法概念図

本研究では、ライブラリー構築法を含めた Hishot 法のプロトコルを確立し、実証試験としてランダム配列ライブラリーから標的に結合するペプチドの取得を行い、抗体作製法に代わる新しい分子認識薬の作製法を確立することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

低温発現誘導性大腸菌用発現プラスミド pColdIV の翻訳領域に His タグを付加した VpreB と Ig 重鎖可変領域の融合遺伝子を挿入し、3' 領域に shot47 配列を挿入したプラスミド（pHishot12）を作製した。Ig 重鎖可変領域の CDR3 領域にランダムオリゴヌクレオチドを鋳型に作製した DNA 断片を挿入することで、ランダム領域を持つ scFv ペプチドライブラリーを作製した。

このプラスミドライブラリーにより形質転換された DH5α を培養して増殖させた後、低温ショックにより scFv ペプチドの発現を誘導した。大腸菌をリゾチームを用いてスフェロイド化させ、界面活性剤を用いて溶菌し、mRNA と scFv ペプチドの複合体を回収して、標的蛋白質を固定した Affi-gel ビーズを用いてセレクションを行った。ビーズを洗浄後、mRNA を TRIzol を用いて抽出、精製し、RT-PCR により CDR3 領域を増幅した。

PCR 断片を制限酵素消化後、再度 pHishot12 に挿入し、標的蛋白質に結合するペプチド配列が濃縮されたプラスミドを得た。この発現誘導とセレクション、RT-PCR による結合配列の増幅のサイクルを 2,3 回繰り返して、目的とする配列を濃縮した。その後、クローニングと ELISA によるスクリーニングによって標的に特異的に結合する scFv ペプチドを産生するクローンを単離し、シーケンスをおこなって塩基配列を決定した。特異性と結合性の評価は ELISA を用いて行った。

4. 研究成果

○ 得られた成果

(1) 高効率ライブラリー作製法を含む Hishot 法の標準プロトコルを確立し、ヒトインテリクチン-1 およびヒト TNF- α に特異的に結合する scFv ペプチドクローンを単離した (発表論文 1)。

① mRNA 中の shot47 の至適挿入位置をモデル実験系を用いて検討した (図 2)。挿入位置は翻訳領域直後に設定したものが mRNA の回収量が最も優れていた。

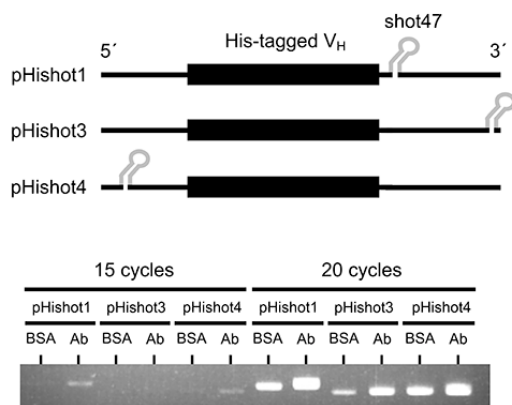


図 2 shot47 タグの至適位置の決定

② 複数の抗体フラグメントおよびペプチド配列を用いて、結合親和性が高く、非特異的吸着が少ない配列を検討した。その結果、ヒト VpreB に Ig 重鎖可変領域を連結し、Cys を Ala に置換し、N 末端側に His タグ配列を付加した scFv ペプチドが、Hishot 法で用いるペプチドとしてもっとも優れていることが判明した。そこでこの遺伝子を大腸菌コドンに最適化した遺伝子を用いて大腸菌用発現ベクター pHishot12 を作製した (図 3)。

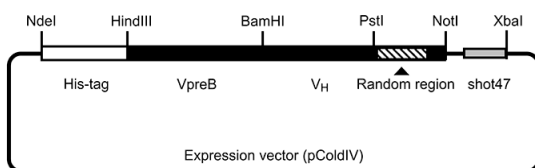


図 3 pHishot12 の構造

③ ヒトインテリクチン-1 およびヒト TNF- α に特異的に結合する scFv ペプチドクローンを単離した。Hishot 法により得られた scFv ペ

プチドクローンは標的に対して特異的に結合した (図 4)。scFv ペプチドは His タグを利用して精製可能で、精製した scFv は濃度依存的に標的に結合した (図 5)。scFv クローンより His タグを除去し、N 末端側にヒトインテリクチン-1 のシグナル配列、C 末端側にウサギ IgG の Fc 領域を連結した抗体型クローンを作製し、ウサギ腎細胞株 RK-13 にて発現させた。それぞれの抗体型クローンは培養上清に分泌され、特異的 ELISA の一次抗体として使用可能であった。TNF- α に対するクローンは scFv 領域内のジスルフィド結合が構築されるようにすることで標的に対する反応性が向上した (図 6)。

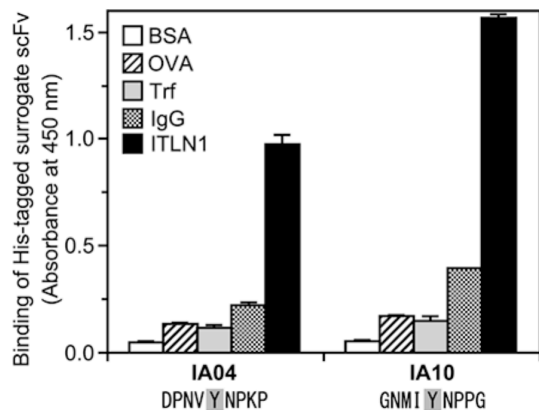


図 4 標的に対する scFv の特異的結合

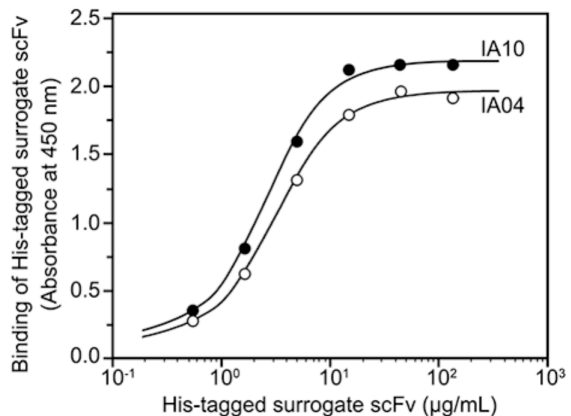


図 5 精製 scFv の濃度依存的結合

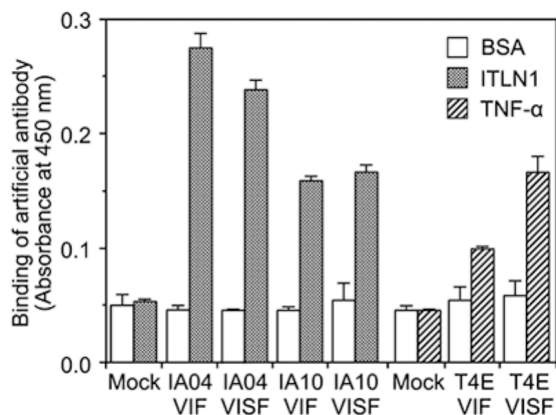


図 6 抗体化した scFv の標的への結合

(2) 陽性対照として樹立した抗インテレクチン-1 モノクローナル抗体が上皮型悪性胸膜中皮腫に特異的に結合することを見だし、病理診断マーカーとして既存の中皮腫マーカーよりも優れていることを発表した(発表論文2)。

(3) 中皮腫患者の胸水中には多量のインテレクチン-1 が分泌されており、開発したインテレクチン-1 の sandwichELISA を用いることで測定が可能であり、胸水中の中皮腫マーカーとしてと有望と考えられることを発表した(発表論文3)。

○ 位置づけとインパクト

本研究により、動物を使用せずにモノクローナルな抗体型ペプチドを作出する技術の開発に成功した。Hishot 法により得られる分子認識ペプチドは容易に純化可能で大量調製も容易であり、研究面、産業面への応用が容易と考えられる。また、動物免疫法と異なり、動物やその飼育施設などを必要とせず、コスト面や倫理面でも問題が発生しにくい。今後、抗体作製に替わる分子認識薬作製の新しいスタンダードになりうるポテンシャルを秘めた技術となり得ると考えられる。

○ 今後の展望

本研究により、Hishot 法は原理的にはほぼ問題なく、特異的な分子認識ペプチドを得るために試行出来ることが明らかとなった。一方で、未だ scFv の配列とセレクション法に由来する特異的親和性の低さが問題点として残されており、病理診断や臨床応用が可能な強力な結合性を持つクローンを得るためには、更なる scFv ペプチドの改良が不可欠であると考えられる。Hishot 法を真に実用的な技術とするためには、より非特異性結合が低く、親和性の高いクローンがとれやすい scFv 配列を開発する必要がある、更なる改良が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Shoutaro Tsuji, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Takashi Ohtsu, Katsuo Suzuki, Shintaro Kato, Joe Akitomi, Makio Furuichi, and Iwao Waga. 2013. Hishot display—a new combinatorial display for obtaining target-recognizing peptides. PLoS ONE 8(12): e83108. doi: 10.1371/journal.pone.0083108. (査読有)

(2) Kota Washimi, Tomoyuki Yokose, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki,

Mitsuyo Yoshihara, Yohei Miyagi, Hiroyuki Hayashi, and Shoutaro Tsuji. 2012. Specific expression of human intelectin-1 in malignant pleural mesothelioma and gastrointestinal goblet cells. PLoS ONE 7(7): e39889. doi: 10.1371/journal.pone.0039889. (査読有)

(3) Shoutaro Tsuji, Yukio Tsuura, Takao Morohoshi, Tsutomu Shinohara, Fumihiko Oshita, Kouzo Yamada, Yoichi Kameda, Takashi Ohtsu, Yoshiyasu Nakamura, and Yohei Miyagi. 2010. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. British Journal of Cancer 103(4):517-523. doi: 10.1038/sj.bjc.6605786. (査読有)

[学会発表] (計 22 件)

(1) Shoutaro Tsuji, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Takashi Ohtsu, Katsuo Suzuki, Shintaro Kato, Joe Akitomi, Makio Furuichi, Iwao Waga. Hishot display - a new combinatorial display for obtaining artificial antibody. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫), 2013.12.3.

(2) Shoutaro Tsuji, Kota Washimi, Taihei Kageyama, Tomoyuki Yokose. 悪性度の高い胃がんにおけるインテレクチン-1の発現. 第72回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川), 2013.10.3.

(3) Taihei Kageyama, Kota Washimi, Mitsuyo Yoshihara, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Shoutaro Tsuji. Usefulness of the new pathological diagnostic marker for malignant pleural mesothelioma. 第72回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川), 2013.10.3.

(4) 辻祥太郎, 影山泰平, 鷺見公太, 山下真紀子, 横瀬智之, 諸星隆夫, 津浦幸夫. 上皮型中皮腫におけるインテレクチン-1の発現と診断マーカーとしての評価. 第4回Japan Mesothelioma Interest Group研究会, 京都私学会館(京都), 2013.8.31.

(5) Shoutaro Tsuji, Kota Washimi, Makiko Yamashita, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Yohei Miyagi. インテレクチン-1は上皮型悪性胸膜中皮腫の優れた診断マーカーである, 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌(北海道), 2012.9.21.

(6) Makiko Yamashita, Kota Washimi, Taihei Kageyama, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Shoutaro Tsuji. 悪性胸膜中皮腫と腸上皮化生におけるマーカー蛋白質の発現の比較. 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌(北海道), 2012.9.21.

(7) Taihei Kageyama, Makiko Yamashita, Katsuo Suzuki, Mitsuyo Yoshihara, Kota Washimi, Tomoyuki Yokose, Yohei Miyagi, Shoutaro Tsuji. 悪性胸膜中皮腫に対するモノクローナル抗体の作製. 第71回日本癌学会学術総会, ロイトン札幌 (北海道), 2012.9.21.

(8) 鷺見公太、辻祥太郎ほか 悪性胸膜中皮腫の組織診断におけるintelectin-1の有用性. 第101回日本病理学会総会, 京王プラザホテル (東京), 2012.4.28.

(9) Shoutaro Tsuji, Kota Washimi, Yohei Miyagi and Takashi Ohtsu. 悪性胸膜中皮腫におけるインテレクトイン-1の発現, 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知), 2011.10.3.

(10) Shoutaro Tsuji, Yukio Tsuura, Takao Morohoshi, Tsutomu Shinohara, Fumihiko Oshita, Kouzo Yamada, Yoichi Kameda, Takashi Ohtsu, Yoshiyasu Nakamura, and Yohei Miyagi. Secretion of intelectin-1 from malignant pleural mesothelioma into pleural effusion. The 10th International Conference of the International Mesothelioma Interest Group, 京都国際会議場 (京都), 2010.9.2.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ペプチドを認識するアダプター

発明者: 辻 祥太郎, 秋富 穰, 加藤 信太郎, 和賀 巖, 大津 敬

権利者: 独立行政法人神奈川県立病院機構、NEC ソフト株式会社

種類: 特許権

番号: PCT/JP2010/058221

出願年月日: 2010.5.14.

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 祥太郎 (SHOUTARO TSUJI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・がん治療学部・主任研究員

研究者番号: 30285192

(2)研究協力者

影山 泰平 (TAIHEI KAGEYAMA)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・がん治療学部・特別研究員

研究者番号: 20633473

山下 真紀子 (MAKIKO YAMASHITA)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・がん治療学部・客員研究員

研究者番号: 60397776

鷺見 公太 (KOTA WASHIMI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター (臨床研究所)・その他部局・医師

研究者番号: 30716733