

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656535

研究課題名（和文） 特殊細胞分化誘導性ペプチドの新規探索法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel methodology for exploration of peptides that induce cell differentiations

研究代表者

和田 章 (WADA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・専任研究員

研究者番号：90443051

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、細胞現象に関与する様々なタンパク質と相互作用することを想定した人工ペプチドの集団(ペプチドライブラリー)を設計・合成すると共に、その中から、特定の細胞機能を誘導するペプチドを探索・同定する新たな手法の開発に取り組んだ。そして、本手法による新規ペプチドの創出の基礎原理の確立により、その生物学的応用を視野に入れた展開を見込めるに至った。

研究成果の概要（英文）：

In this research, artificial libraries of peptides that interact with a wide variety of proteins related to cell phenomena were originally designed and constructed. Furthermore, a novel methodology for exploration and identification of specific cell function inducing peptides from the peptide libraries was tried to be developed. The fundamental principal for creation of new peptides using the methodology could be applied to various biological studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ペプチド・細胞機能

### 1. 研究開始当初の背景

花粉、食物、環境に存在する化合物などのアレルゲンが引き起こす「免疫系疾患」、神経細胞に関連するタンパク質の異常凝集が原因とされる「神経系疾患」、細胞内外のシグナル伝達系を司る酵素やタンパク質の異常機能が増殖・悪性化を引き起こす「各種がん」は、生活の質(QOL)を著しく低下させる

国民的疾患と言える。それゆえ、それらの早期診断技術及びより効果率な治療法の開発の期待は高まるばかりである。現在、これらに代表される疾患の主な治療法は、薬物投与であるが、長期服用や副作用などの多くの問題は未だ解決されていない。その一方、ヒト細胞のリプログラミングによるiPS細胞の開発と近年の目覚ましい普及により、細胞その

ものを利用した医療・治療への道が現実味を帯びてきた。特に、自身の細胞を利用した治療法では、患者への副作用が殆どなく、目的の病気の治癒や症状の改善に大きな効果をもたらすことが期待されている。それゆえ、効率的かつ安全に目的の細胞機能を誘導する新たなバイオテクノロジーの開発が喫緊の課題となっている。

## 2. 研究の目的

これまでに研究代表者は、タンパク質や生体材料などの標的分子に対して特異的に結合する人工ペプチド(ペプチドアダプター)を試験管内で選択・同定する「リボソームディスプレイ法」の開発に取り組んできた。

そこで本研究課題では、これまでに得られたペプチドアダプターの選択やペプチドの合成に関する知見を応用して、細胞現象に関与する様々なタンパク質との相互作用を想定した人工ペプチドの集団(ペプチドライブラリー)を設計・合成する。さらに、そのペプチドライブラリーの中から、特定の細胞機能を誘導する新規ペプチドを探索・同定する新たな手法の開発に取り組む。そして、この手法を利用して探索した人工ペプチドとそれらのキャラクターリゼーションの結果をもとに、本研究の設計指針をはじめ、ペプチド探索戦略の有用性や汎用性などを総合的に評価することを目的とした。つまり、本手法の開発とその基礎原理を確立すれば、様々な研究目的に対応した細胞機能を誘導するペプチドを創出できるだけでなく、本研究から創出されるペプチド・バイオテクノロジーが、生命科学・細胞工学などの学術的研究、将来の細胞を利用した先進医療・創薬の発展に貢献することを目指している。

## 3. 研究の方法

本研究で開発する新たな探索法の特徴としては、(1)細胞現象に関与する様々なタンパク質と相互作用する人工ペプチドのライブラリーの設計と合成、(2)特定の細胞機能を誘導する人工ペプチドを探索・同定するシステムの構築にある。

(1)では、各種アミノ酸がランダムに出現する「ライブラリー配列」と、細胞膜を能動的に透過することを可能にする「細胞膜透過性配列」により構成した人工ペプチドライブラリーを試験管内で合成する。さらに、(2)

では、細胞内で発現しているタンパク質群と人工ペプチドとの特異的な相互作用により、特定の細胞機能が誘導されたことを追跡する「細胞機能検出システム」を設計する。そして、各種ペプチドライブラリーと細胞機能検出システムの融合と最適化により、目的とする人工ペプチドを探索する基礎原理とそれを利用した新手法の確立に取り組んだ。

## 4. 研究成果

本研究課題では、細胞膜透過性を有する人工ペプチドライブラリーの設計と合成として、まず、細胞内に存在する様々なタンパク質と人工ペプチドを相互作用させるため、20種類のアミノ酸でランダム化したライブラリー配列を「標的分子結合性ドメイン」として人工ペプチドに導入した。一方、哺乳類細胞に感染するウイルスなどは、細胞膜透過性を発現するため、独自のペプチド配列(Tat、ペネトラチン配列など)を進化的に獲得していることが知られている。そこで、細胞膜を能動的に透過し、細胞質もしくは細胞核に局在化させる天然由来の配列を「細胞内局在性ドメイン」として人工ペプチドに融合した。そして、これらの各ドメインは、DNA レベルで構成し、直鎖状のDNA テンプレートとして作製した。さらに、各種DNA テンプレートが無細胞タンパク質合成系の利用により、目的とする人工ペプチドライブラリーを小規模かつ短時間で調整できるプロトコルを確立した。今回、各ドメインの機能発現に最適な構造を決定するため、試験管内における各種ペプチドの発現効率、細胞内局在性、細胞毒性の評価を総合的に行った。

ここでは、本研究課題に最適な細胞内局在性ドメインを決定するため、蛍光標識型ペプチド(① : TMR-FLAG-PRS、② : TMR-FLAG-HT-PRS)を発現するDNA テンプレートを作製した(TMR : Tetramethylrhodamine, FLAG : DYKDDDDK 配列, HT : HIV Tat 配列, PRS : プロテアーゼ耐性配列)。そして、蛍光分子 TMR 修飾型 tRNA を利用した無細胞タンパク質合成系により、蛍光標識型ペプチド①及び②を合成した後、SDS-PAGE と蛍光イメージ測定により発現効率を評価した。さらに、各種ペプチドを単球系細胞に添加したところ、ペプチド②だけが、細胞膜を効率的に透過し、細胞質全体に拡散している蛍光イメージを観測することができた。つまり、HIV Tat

配列の融合により、細胞膜透過性を有した人工ペプチドを試験管内で合成できることが明らかとなった。一方、ペネトラチン配列を導入したペプチド③を合成し、単球系細胞に添加したところ、ペプチド③が細胞内に取り込まれる現象を観測することはできたものの、エンドソーム内から放出されにくいことが明らかとなった。それゆえ、本研究課題では、「細胞内局在性ドメイン」として、HIV Tat 配列を使用することにした。

次に、人工ペプチドライブラリーモデルを合成・評価するため、PRS を排除すると共に、ライブラリー配列と同じアミノ酸残基数を有する V5 配列で構成した蛍光標識型ペプチド(④ : X-V5-CS、⑤ : X-V5-HT)を合成する DNA テンプレートを新たに作製した(X : 蛍光分子 TMR/Bodipy 誘導体, CS : コントロール配列)。そして、蛍光分子 X 修飾型 tRNA を導入した無細胞タンパク質合成系により、蛍光標識型ペプチド④及び⑤を発現させた後、SDS-PAGE と蛍光イメージ測定により発現効率を定量した。続いて、各種ペプチドをがん細胞(HeLa, HT1080)に添加したところ、ペプチド⑤だけが、細胞膜を積極的に透過し、細胞質および細胞核に局在化することが、蛍光顕微鏡観測により明らかとなった。つまり、蛍光分子の種類やPRSの有無に関係なく、HIV Tat 配列の融合により、短鎖ペプチドであっても細胞膜透過性・局在性を付与できることが明らかとなった。その一方、ペプチドを添加することで、一様に細胞活性が低下する現象が観測されただけでなく、非特異的な細胞死が一部誘導されてしまうことも明らかとなった。それゆえ、細胞内局在性ドメイン等の影響による細胞毒性を最小限にするため、人工ペプチドライブラリーの発現量を調整した至適条件を決定した。そして現在、特定の細胞機能を誘導する人工ペプチドにより蛍光/発光現象が生じる「細胞機能検出システム」の構築に至っている。

今回、本研究で得られた成果の一部は、シンポジウムや研究会等において発表することで、本研究の有用性などを議論することができただけでなく、そこから得られた知見は、本研究課題の問題点やそれらの解決策に活かすことができた。また、それらペプチドライブラリーを利用したペプチド探索の原理とシステム化までの特許化することを視野に入れた研究展開へと繋げている。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

① 和田 章 「生物機能を模倣する人工ペプチドの創出」、第 3 回・新規材料創製を目指した合成生物学、2012 年 11 月、理化学研究所 脳科学総合研究センター (埼玉)

② 和田 章 「ペプチド・バイオテクノロジーの開発から生体機能性金属材料の創製へ」、第 43 回 中部化学関係学協会支部連合 秋学大会、2012 年 11 月、名古屋工業大学 (愛知)

③ 和田 章 「細胞機能を誘導する人工ペプチドの創出」、第 2 回新規材料創製を目指した合成生物学、2012 年 1 月、理化学研究所 横浜研究所 (神奈川)

④ 和田 章 「新規バイオディスプレイ法の開発によるアプタマー・バイオエンジニアリングの展開」、CREST シンポジウム: トップダウンとボトムアップの融合によるナノ構造の作製と新機能発現、2011 年 10 月、東京大学 (東京)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 核酸構築物、核酸-蛋白質複合体、及びその利用

発明者: 和田 章・長田 裕之

権利者: 理化学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2011-115166

出願年月日: 平成 23 年 5 月 23 日

国内外の別: 国内

名称: Nucleic acid construction, nucleic acid-protein complex and use thereof

発明者: Akira Wada・Hiroyuki Osada

権利者: RIKEN

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/63221

出願年月日: 平成 24 年 5 月 23 日

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 章 (WADA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラ

リー評価研究チーム・専任研究員

研究者番号：90443051