

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 17 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620127

研究課題名(和文)10BASEd-T法による疾患蛋白質分解触媒の開発

研究課題名(英文)Artificial protease discovery via the 10BASEd-T

研究代表者

灌 真清 (TAKI, Masumi)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・准教授

研究者番号：70362952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本萌芽研究では、申請者が開発した人工分子コアをファージ上で進化させる手法(10BASEd-T)を用いて、単に標的に結合する人工分子を取得するだけでなく、標的蛋白質を分解治療する触媒の取得を目指して研究を行った。現在までに、予期していた切断活性を有するクローンの取得には至っていないが、一連の過程において、人工分子コア(サリチル酸骨格)がストレプトアビジンに対して特異的に結合しうるファーマコフォアの一部になりうることを見だし、10BASEd-T修飾法を用いた人工ファーマコフォアライブラリーの作製コンセプトおよび実施例をまとめ発表を行った。Molecules, 19, 2481(2014).

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated generation of a novel pharmacophore from artificial drug-like core structure (i.e. salicylic acid) by optimization of the surrounding peptide sequence. The point is that the drug-like core structure is never known to bind to a target protein. That is entirely different from improvement of a known drug structure by similar in vitro selection. We hope that computer assisted de novo designing, data mining from broad public databases, and/or docking simulation of the small drug-like core molecule followed by optimization of its surroundings by peptide via the 10BASEd-T would be a general technology for drug discovery. This has been published in an open-access journal of Molecules, 19, 2481-2496 (2014).

研究分野：進化分子工学

キーワード：10BASEd-T T7ファージ ファージディスプレイ 人工分子コア 分子進化 ファーマコフォア ライブラリー 触媒

1. 研究開始当初の背景

機能性生体分子であるペプチドを有機化学的に拡張して、高機能性人工分子ライブラリーを作製する試みが、近年注目されている。特に、*in vitro* 翻訳中に人工分子を非天然アミノ酸の形で蛋白質内の特定の位置に取り込ませることで、有機分子-ペプチドハイブリッド型分子ライブラリーを作製する系が広く知られている(菅教授らの総説、*Curr. Opin. Chem. Biol.*, 16, 196 (2012))。

一方で多様性が若干劣るものの、大腸菌に感染するウイルス(ファージ)上に提示させたペプチドライブラリーに対して、人工官能基化を施すことで、同様に高機能性分子を取得する方法が提唱されている(R. Derda 教授らの総説、*ACS Chem. Biol.*, 7, 123 (2012))。ファージディスプレイ系は、*in vitro* 翻訳系と異なり予算や規模の限られている施設で、少ない人数で誰でも簡単に、大腸菌(とその産物)だけで高機能性人工分子ライブラリーを作製可能である。しかしながら、ファージは巨大な分子集合体であるため、提示ペプチド特異的修飾は極めて難しく、申請時において、実現例は M13 ファージディスプレイ系を使った数例しかなかった(Winter 教授ら、*PEDS*, 17, 709 (2004)および *Nat. Chem. Biol.*, 5, 502 (2009))。これらの報告において、反応特異性などの詳細な記述はなされておらず、後者の論文では副反応や修飾ファージの大腸菌への感染能低下の問題も報告されていた。

申請者は、バイアスのかかりづらい高品質なライブラリーの取得が可能であり、取り扱いの容易さも併せ持つ T7 ファージ(申請者の総説、*J. Nucl. Acids* (2012))に着目し、提示ペプチド特異的に、様々な有機分子で定量的に修飾する手法(10BASEd-T)を世界で初めて開発し、詳細な構造決定を行うことに成功した。この手法を用いて人工分子コアを進化させることで、標的蛋白質特異的に結合する人工分子を選択していた。

2. 研究の目的

本萌芽研究では、上記手法(10BASEd-T)を用いて、単に標的に結合させるのみならず、疾患関連蛋白質を分解治療する触媒の取得を行うことで、難病治療の基幹技術を確立することを目的とした。最終的には、潜在的アルツハイマー病原因蛋白質(リン酸化タウ)などを生体内で特異的に分解する人工触媒を取得することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 概要

T7 ファージ上に提示されている 10 億

種類の人工ライブラリーペプチドに対し、蛋白質分解触媒活性を有する可能性を持つ人工分子コアを位置特異的に結合させる。

上記人工ライブラリーの中から、標的蛋白質だけに特異的に結合し、分解するファージクローンを選び出し、ペプチドの持つアミノ酸配列を決定する。

上記人工ハイブリッド分子を化学合成し、同様に標的蛋白質分解能を確認する。

(2) 詳細

実際の疾患関連蛋白質に先立ち、モデル標的蛋白質としてストレプトアビジンを用い、これを特異的に認識して切断する人工触媒の取得を以下の流れに従って試みた。

既に作製されている T7 ファージライブラリーに対し、10BASEd-T 修飾法にてサリチル酸骨格を持つ分子(人工分子コア)を結合させ、人工ファージライブラリーとする。

前述のストレプトアビジンがゲル上へ固定化されたものに対して、のライブラリーを作用させ、ストレプトアビジンのみ結合するファージを選び出す。その際、サリチル酸残基の触媒能が強すぎて、人工ハイブリッド分子内のペプチド残基やゲル上のストレプトアビジンを分解してしまう可能性があることを考慮し、本操作は全て低温(4℃)にて行う。

ファージを結合した上記ゲルの洗浄を行ったのち、ゲル上に残ったファージを大腸菌に直接感染させ増幅させる。増幅したファージに、再度 10BASEd-T 修飾を施し、上記操作(セレクション)を繰り返す。これを数ラウンド行う。

こうして選択された、ストレプトアビジン結合性ペプチドを持つ人工ファージクローンの中から、ストレプトアビジンだけを生理的条件(pH=7, 37℃)にて特異的に切断するクローンを選び出す。触媒活性を有するクローンの遺伝情報を、DNA シーケンサーを用いて解読し、人工分子におけるペプチド残基のアミノ酸配列を決定する。

上記配列を持つペプチドにサリチル酸を結合させたものを化学合成して、ストレプトアビジンを特異的に切断するか、と同様に確かめる。

4. 研究成果

(1)

T7 ファージライブラリーに対し 10BASEd-T 修飾法にてサリチル酸骨格を持つ分子を結合させ、人工ファージライブラ

リーへと変換する際のモデル実験として、提示ペプチド配列が既に分かっているモデルファージ（モノクローン）を用いて 10BASEd-T 法によるサリチル酸修飾が特異的に進むことを確認し、発表を行った。このとき最適化した反応条件を用いて作製したファージライブラリーを、ストレプトアピジン固定化ビーズに対して作用させ、種々の条件にてセレクション/切断実験を行った。具体例としては、提示ペプチド内にサリチル酸を複数個持つ人工ファージライブラリーを作製しセレクションを試みたのち、亜鉛イオン等の存在下で切断を試みるなどした。この場合、サリチル酸は 2 価金属配位子として働き、金属部分 (Zn²⁺) がルイス酸触媒中心となるので、サリチル酸単独であるときとは異なる反応機構での標的蛋白質切断 (Sue, Acc. Chem. Res., 36, 562 (2003)) を期待した。現在までに金属の存在の有無に関わらず、予期していた活性を有するクローンの取得には至っていないが、一連の過程において、サリチル酸骨格自体がストレプトアピジンに対して特異的に結合しうるファーマコフォアの一部になりうることを見だし、10BASEd-T 修飾法を用いた人工ファーマコフォアライブラリーの作製コンセプトおよび実施例を総合論文としてまとめ発表を行った。

(2)

(1) において、2 価金属イオンをルイス酸触媒として利用する概念を発展させ、2 価金属イオンと配位結合する可能性を持ち電子状態の異なる有機配位化合物を、パラレル合成法にて網羅的に合成・精製した。NMR および LC-MS 測定などを行うことで同定したのち、これらの化合物と金属イオンとを混合して配位結合させ、モデル蛋白質であるストレプトアピジンのほかに、ウシ血清アルブミン (BSA) などに対しても作用させることで、各々の蛋白質切断能を確かめた。生理的条件下で 37 °C 一晩インキュベーションを行ったのち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にて確認を行ったところ、幾つかの金属錯体の存在下で BSA の断片化が見られた。現在、切断反応速度の向上を目指し、有機配位化合物 (人工分子コア) の構造最適化および反応機構の解明を行っている最中である。

(3)

(1) において切断が起きない原因として、人工分子コア周辺のランダムペプチド部分が短すぎて適切な反応場を形成しない可能性もある。そこで、適切な反応場を形成しうる 3D 構造を持つランダムペプチドライブラリーの再作製を行った。具体的には、予め 3D 構造を持つことが分かっているペプチドライブラリーをコードする DNA を作製し、遺伝子工学的な手法にて、市販の

T7Select10 ベクター内のマルチクローニングサイト内に挿入することでライブラリーを作製し、これらを T7 バクテリオファージ内にパッケージングした。SDS-PAGE およびブランク形成実験などから、本ペプチドがファージ上にて適切に提示されていること、および、本ペプチドライブラリーは 10⁷ 以上の多様性を持つことを確認した。10BASEd-T 反応を利用して同ライブラリーペプチドに対し人工分子コアを共有結合可能なこと、および、ペプチドライブラリーに用いているスカフォールドが特有の 3D 構造を持っていることも確認を行っている。現在、上記 (2) にて最適化を行った幾つかの人工コアを本ペプチドライブラリーに結合したものをを用いて触媒の探索 (セレクション) を行っている最中である。

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 5 件; 査読有り)

K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito, M. Minami, and M. Taki, Construction of a crown ether-like supramolecular library by conjugation of genetically-encoded peptide linkers displayed on bacteriophage T7, Chem. Commun., 50, 3921-3923 (2014), inside cover article.

Y. Tokunaga, Y. Azetsu, K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito and M. Taki, Pharmacophore generation from a drug-like core molecule surrounded by library peptide via the 10BASEd-T on bacteriophage T7, Molecules, 19, 2481-2496 (2014).

K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito, and M. Taki, An Artificial Molecule-Peptide Hybrid Discovered via the 10BASEd-T Binds to the Substrate-Binding Site of Glutathione S-Transferase, Peptide Science 2013, p.91-92 (2014).

Y. Tokunaga, K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito, and M. Taki, Selection of Streptavidin-Binding Artificial Peptide Possessing Salicylic Acid Moiety via the 10BASEd-T on the Bacteriophage T7, Peptide Science 2013, p.173-174 (2014).

K. Fukunaga, T. Hatanaka, Y. Ito, and M. Taki, Gp10 based-thioetherification (10BASE(d)-T) on a displaying library peptide of bacteriophage T7, Molecular BioSystems, 9, 2988-2991 (2013).

〔学会発表〕(計 9 件)

Hiroaki Inoue, Rika Asano, Masumi Taki、Artificial macrocycle as functional-equivalent of catalytic protein、第 51 回ペプチド討論会、2014/10/22、徳島。

福永 圭祐・伊東 祐二・南 道子・瀧 真清、10BASEd-T 法を用いた人工分子の進化、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム(日本化学会)、2014/09/13、岡山。

Masumi Taki、Drug discovery systems engineering: construction of peptide/protein-hybrid molecules via the NEXT-A and/or the 10BASEd-T reaction、BIT's 7th annual congress of industrial biotechnology-2014、2014/04/27、Dalien。

Masumi Taki、Cancer detection and cure, The 2nd conference on interdisciplinary research in traditional medicine and modern medical bioscience、2014/04/24、Nanjing medical university。

Keisuke Fukunaga, Takaaki Hatanaka, Yuji Ito, Michiko Minami, and Masumi Taki、Chemical Evolution of Bacteriophage T7-displayed Peptides、4th Asia-Pacific International Peptide Symposium (APIPS 2013)、2013/11/06、Osaka。

Yuuki Tokunaga, Keisuke Fukunaga, Takaaki Hatanaka, Yuji Ito, and Masumi Taki、Optimization of a Pharmacophore by Peptide Conjugation via the 10BASEd-T on the Bacteriophage T7"、4th Asia-Pacific International Peptide Symposium (APIPS 2013)、2013/11/06、Osaka。

福永 圭祐・瀧 真清、T7 フェージ上での人工ペプチドライブラリーの作製、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム(日本化学会)、2013/09/29、名古屋市。

Keisuke Fukunaga and Masumi Taki、Gp10 based-thioetherification (10BASEd-T) on a displaying peptide of the bacteriophage T7、10th Australian International Peptide Conference、2013/09/08-13、Malaysia。

瀧 真清、創薬システムエンジニアリング:NEXT-A 法および 10BASEd-T 法の開発、H25 年度夏期複合材料研究会、2013/07/21、草津市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://tkl.pc.uec.ac.jp/>

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
瀧 真清 (TAKI, Masumi)
電気通信大学・大学院情報理工学研究
科・准教授
研究者番号：7 0 3 6 2 9 5 2
- (2)研究分担者 -
- (3)連携研究者 -