

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350978

研究課題名(和文) ナノチューブ内マイクロ環境を利用した分子進化学の高度化に関する研究

研究課題名(英文) Utilization of microenvironment of nanotubes in in-vitro evolution

研究代表者

久保 泰 (Kubo, Tai)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・副研究センター長

研究者番号：10178030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生物進化過程で保存されてきたある種の生理活性ペプチドの分子骨格は、ランダムな配列を空間提示するのに都合がよく、それを鋳型とするランダムペプチドライブラリからの試験管内分子進化技術は標的認識分子の創製にとって極めて有効である。本研究において有機ナノチューブ存在下で生理活性ペプチドの無細胞翻訳を行ったところ、ペプチドのリフォールディングが促進され、その活性回収率が向上することを見出した。この研究成果により、目的とする特異的認識分子の単離・同定に至る時間の大幅な短縮、リード探索の効率化が可能となり、引いては創薬の迅速化に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that organic nanotubes promoted refolding and thus leading innate activity of peptides when applied to the in-vitro translation reaction of the peptides. The observation was successfully adopted to the in-vitro evolution technology to construct a random peptide library with improved content of active peptides.

研究分野：分子進化学

キーワード：試験管内進化 マイクロ環境 リフォールディング 生理活性ペプチド 分子進化

1. 研究開始当初の背景

試験管内進化 (*in vitro* evolution, IVE) 技術は、標的分子特異的認識能を有する分子を創製するための有効な手段で、バイオマーカー検出用の分子プローブ作製やイメージングツール、抗体医薬に代替するバイオ創薬などに広く活用できる。我々は生物進化過程で保存されてきたある種の生理活性ペプチドの分子骨格がランダムな配列を空間提示するのに都合がよいことを見出し、それを鋳型とするランダムペプチドライブラリからの試験管内分子進化技術を確立した (*Nucleic Acid Res.*, 2009; *Molecular Brain*, 2011; *Anal. Biochem.*, 2011; *Toxicon*, 2012 他)。このライブラリは、コンパクトな分子骨格と極めて高い母集団数 (理論上、 10^{15} 以上の分子種) を特徴とするが、それらを保証するためには、合成されたペプチドが効率よくリフォールディングして有効なコンフォメーション形成することが求められた。この技術改良は、目的とする特異的認識分子の単離・同定に至る時間の大幅な短縮、リード探索の効率化を実現し、引いては創薬の迅速化に繋がると期待される。

2. 研究の目的

我々は、生物進化の過程で保存されてきたある種の生理活性ペプチドの分子骨格がランダムな配列を空間提示するのに都合がよいことを見出し、それを鋳型とするランダムペプチドライブラリを IVE に適用すると多様な標的認識分子 (ペプチド) を創出することができることを示した。このペプチドライブラリの鋳型となる分子骨格は、disulfide (S-S) 結合や β 構造などによりコンパクトで堅牢な構造を持つ。そのため、これらの構造を如何に天然に近い形で効率よく再現するかが、ペプチド IVE 法の鍵となる。本研究提案では、有機ナノチューブがタンパク質の翻訳過程でリフォールディングを促進し活性タンパク質を再生するのに極めて有用であるという最近の知見 (*ACS Nano*, 2012) を基盤として、有機ナノチューブの種類や反応条件をシステムティックに検討し、IVE のプロセスに有機ナノチューブのミクロ環境を利用したより安定で収率の高いペプチドリフォールディングを達成し、IVE の高度化・汎用化を目指した。

3. 研究の方法

3-1 ライブラリ構築に適した分子骨格を有する生理活性ペプチドをコードする cDNA 構築

我々の知見に基づき加速進化型の遺伝子を有する 3 種類のペプチドを本研究のモデルペプチドとして選択した。それらをコードする cDNA を cDNA ライブラリから単離、もしくは PCR により取得した。

(a) GTx1-15 (34 aa, 3 S-S 結合)

クモ毒由来で T-type Ca^{2+} チャンネルブロッ

カーとして同定した ICK (inhibitor cystine knot) モチーフを有する GTx1-15

配列:

DCLGFMRKCI PDNDKCCRPNLVCSRTH
KWCKYVF

(b) BPTI (58 aa, 3 S-S 結合)

Kunitz 型のタンパク質加水分解酵素阻害剤である BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)

配列:

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAG
LCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTC
GGA

(c) α -Bgtx (74 aa, 5 S-S 結合)

蛇毒由来の神経毒であるスリーフィンガー型ペプチドの α -bungarotoxin (α -Bgtx)

配列:

IVCHTTATSPISAVT CPPGENLCYRKMW
CDAFCSSRGKVVELGCAATCPSKKPYEE
VTCCSTDKCNPHPKQRP

3-2 有機ナノチューブ存在・非存在下での生理活性ペプチドの無細胞翻訳の条件検討

前記 3 種類の生理活性ペプチドをコードする cDNA から SP6 RNA polymerase による *in vitro* transcription を行い、それぞれの cRNA を調製した。この cRNA を用い有機ナノチューブの存在・非存在下で無細胞翻訳系 (ウサギ網状赤血球ライゼート、あるいは小麦胚芽抽出液) においてタンパク質翻訳を行い、ペプチドを調製した。また事項の活性判定により反応の最適化条件を検討した。

3-3 リフォールディング及び活性発現の検証

ペプチドの生理活性は、それぞれの標的に従い、 α -Bgtx では nAChR のリガンド結合領域と相溶性の高い acetylcholine binding protein (AChBP) との相互作用を SPR や FCCS により検出、あるいは *Xenopus* 卵母細胞を用いた電気生理で nAChR の阻害活性を調べた。また BPTI では蛍光基質を用い trypsin 加水分解反応の阻害活性評価を行った。

4. 研究成果

4-1 ランダムペプチドライブラリの調製

ライブラリの鋳型とした生理活性ペプチドは、(a)クモ毒由来で T-type Ca^{2+} チャンネルブロッカーとして同定した ICK (inhibitor cystine knot) モチーフを有する GTx1-15、(b) Kunitz 型のタンパク質加水分解酵素阻害剤である BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)、(c) 蛇毒由来の神経毒であるスリーフィンガー型ペプチドの α -bungarotoxin (α -Bgtx) の 3 種類である。これらは、アミノ酸残基数、S-S 結合数、立体構造が異なる。このアミノ酸配列の中で進化速度が速く variation の豊富な領域を選んでランダム配列 (NNS or NNB) を組み込んだ cDNA library を構築した。

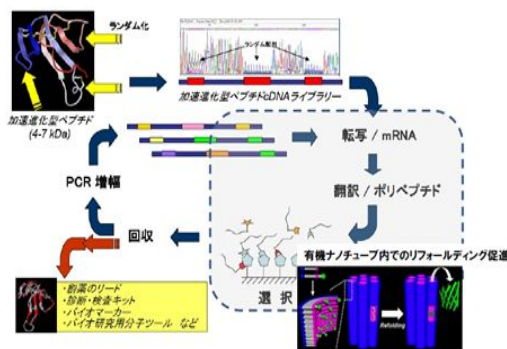
4-2 無細胞タンパク質合成系での有機ナノチューブ利用によるペプチド生産と生理活性評価

α -Bgtx あるいは BPTI を無細胞タンパク質合成する際に、有機ナノチューブ A (知財案件) を 0~10 mM 混合し、反応後 His タグ精製したものについて活性測定を行った。その結果、ナノチューブ存在下での合成反応では従来法に比べて、 α -Bgtx では最大約 3 倍、BPTI では約 7 倍の活性が回収された (論文準備中)。

4-3 有機ナノチューブを利用した IVE

cDNA library より転写反応により mRNA を合成し、puromycin を含むリンカーを mRNA と結合した。これを 4-2 で得た有機ナノチューブ存在の至適条件下で無細胞タンパク質合成を行う。合成時には puromycin が C 末端に取込まれ mRNA-peptide の連結を達成する。これを用いて腫瘍マーカーやリガンド依存性イオンチャネル (LGIC) の細胞外領域を標的として設定した試験管内分子進化を行い、現在までに標的認識活性を有する候補ペプチドを複数同定することができた。これらのペプチドを、化学合成、もしくは大腸菌、アフリカツメガエル卵母細胞による発現により調製・精製し、標的分子との結合活性および細胞を用いた生理活性を確認した。

【今後の方針】現在取得している標的分子を特異的に認識する可能性の高い複数のペプチドについては、標的分子結合性計測を行い、また標的分子を発現した細胞を用いて、当該ペプチドの生理活性の解析を完了する。有効なペプチドについては、分子動力学計算チームとの連携を通じて、その縮小化あるいは分子計算とシミュレーションによる中低分子モデル化を進める。有機ナノチューブの利用方法については、尚改良の可能性は残されていると考えている。無細胞タンパク質合成系での有機ナノチューブの併用については、更に化学組成や形状・反応条件についてシステムティックに検討を続け更なる条件の至適化を探る。



有機ナノチューブ・マイクロ環境を利用した指向的分子進化技術の開発

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6件)

Kubo, T.

“Random peptide library for ligand and drug development” in **Toxins and Drug Discovery**, pp 207-230, Eds. Lourdes J. Cruz, & Sulan Luo, Springer, DOI: 10.1007/978-94-007-6726-3_2-1 (2017) Naimuddin, M., & Kubo, T.

“A high performance platform based on cDNA display for efficient synthesis of protein fusions and accelerated directed evolution.”

ACC Combinatorial Science,

18:117-129 (2016)

Kimura, T. & Kubo, T.

“Peptidome and transcriptome analysis of the toxin-like peptides in the venom glands of tarantula *Grammostola rosea*” in **Spider Venoms**, pp 251-270, Eds. P. Gopalakrishnakone, et al., Springer, DOI:

10.1007/978-94-007-6646-4_13-1 (2016) Yamaguchi, Y., Kimoto, H., Yang, X., Filkin, S., Utkin, Y., Kubo, T., & Inagaki, H.

“Pr-SNTX, a short-chain three-finger toxin from Papuan pigmy mulga snake, is an antagonist of muscle-type nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha_2\beta\delta\epsilon$)”

Biosci. Biotech. and Biochem., DOI:

10.1080/09168451.2015.1065169 (2015)

Kubo, T., Naimuddin, M., & Ono, S.

“In vitro evolution from pluripotent peptide libraries with natural neurotoxin scaffolds to target receptors, proteases and trophic factors”

Protein Science 24:55-56 (2015)

Nemoto, N., Fukushima, T., Kumachi, S., Suzuki, M., Nishigaki, K., Kubo, T.

“Versatile C-terminal specific biotinylation of proteins using both a puromycin-linker and a cell-free translation system for studying high-throughput protein-molecule interactions”

[学会発表](計 23 件)

Single Molecule Motion Maps of Open and Desensitization States of Nicotinic Acetylcholine Receptors, 関口 博史、徳江 真紀、西野 有里、一柳、Naoto Yagi、宮澤 淳夫、久保 泰、佐々木 裕次, Biophysical Society 58 th Annual Meeting, サンフランシスコ、米国、2014/02/19

Functional characterization of three-finger toxins, Pr SNTX and Pr-LNTX, from New Guinean venomous snake, *Pseudechis rossignolii*, 山内 瑤子、ユーリー・ウトキン、木本 光、鳥羽 通久、久保 泰、稲垣 英利, 第 10 回 アジア太平洋国際毒素学会, 中国 長沙、2014/06/15

Utilization of three-finger peptide library and evolution in vitro toward protease inhibitors, Cai Weiyang, Naimuddin Mohammed、稲垣 英利、亀山 仁彦、石田 直理雄、久保 泰, 10th IST Asia Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, 長沙 (中国) 2014/06/16

加速進化型ペプチドの scaffold に基づく多能性ペプチドライブラリの構築と標的的特異的分子の創製, 久保 泰, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜、2014/11/26

高速 1 分子内ダイナミクス計測で捉えるアセチルコリン受容体・機能運動, 関口 博史、徳江 真紀、西野 有里、一柳 光平、久保 泰、宮澤 淳夫、八木 直人、佐々木 裕次, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜、2014/06/25

受容体やイオンチャネルの活性サイトにおける 3D 分子動態可視化に向けた挑戦 生体試料調製編, 久保 泰、関口 博史、宮澤 淳夫、佐々木 裕次, 第 1 回 3D 活性サイト科学ワークショップ, 大阪、2014/11/21

加速進化型ペプチドの分子骨格を利用した多能性ペプチドライブラリの利用技術, 久保 泰, 分子複合医薬研究会, 池田、2015/02/26

加速進化型ペプチドのスキヤフォールドを利用した分子認識, 久保 泰, 人工認識分子研究会, 大阪、2015/06/23

X 線 1 分子追跡法による 5 量体リガンド依存性イオンチャネルの機能的分子内運動解析, 関口 博史、西野 有里、Christele Huron、Jean-Pierre Changeux、池崎 圭吾、Pierre-Jean Corringer、久保 泰、宮澤 淳夫、佐々木 裕次, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 徳島、2015/06/24

パパアピグミーマルガスネークの生理活性ペプチドおよびタンパク質に関する研究, 山内 瑤子、木本 光、鳥羽 通久、久保 泰、稲垣 英利, 第 6 2 回トキシシンポジウム, 三重県志摩市、2015/07/10

Study of Ligand-dependent Single Molecule Dynamics of Nicotinic Acetylcholine Receptor, 宮澤 淳夫、西野 有里、関口 博史、久保 泰、佐々木 裕次, 第 38 回日本神経科学大会, 神戸、2015/07/2

Pluripotent random peptide library inspired by natural neurotoxins in the accelerated gene evolution, 久保 泰、Naimuddin Mohammed、小野 世吾, 10th European Biophysics Congress, Dresden、2015/07/18

In vitro evolution from pluripotent peptide libraries with natural neurotoxin scaffolds to target receptors, proteases and trophic factors, 久保 泰、Naimuddin Mohammed、小野 世吾, 29th Annual Symposium of the Protein Society, Barcelona、2015/07/23

Utilization of neurotoxin-inspired peptide libraries in *in-vitro* evolution, and its proved pluripotency to target GPCRs, proteases and trophic factors, 久保 泰、Naimuddin Mohammed、小野 世吾、広川 貴次, 18th World Congress of the International Society on Toxinology, Oxford, England、2015/09/25

Realtime single molecular motion analysis of nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 by diffracted x-ray tracking method, 久保 泰、馬場 知之、池崎 圭吾、関口 博史、西野 有里、宮澤 淳夫、佐々木 裕次, 60th Annual Meeting of Biophysical Society, ロサンゼルス (米国) 2016/02/28

イオンチャネルの遷移状態識別プローブ創製に向けて, 久保 泰, 大阪大学蛋白

質研究所セミナー，大阪、2016/05/12
X線回折点追跡法と試験管内分子進化技術の融合によるチャンネル分子の遷移過程識別プローブの創製，久保 泰、第 68 回埼玉大学脳科学セミナー，さいたま、2016/07/26

X-ray imaging of single protein's motion with ultra-high speed and accuracy，馬場 知之、池崎 圭吾、関口 博史、久保 泰、佐々木 裕次，The 31st International Congress on High-speed Imaging and Photonics，Osaka、2016 /11/08

リンカー設計およびタンパク質翻訳過程の至適化による試験管内進化技術（cDNA ディスプレイ法）の改良と抗 VEGF-3 本指ペプチドの創製，久保 泰、Naimuddin Mohammed、多田 耕平、大橋 澄子、平家 勇司、五島 直樹，第 39 回日本分子生物学会年会，横浜、2016/12/02

3D Motion Maps of TRPV1 cation channel depicted by Diffracted X-Ray Tracking Method，三尾 和弘、池崎 圭吾、関口 博史、松下祐福、久保 泰、佐々木 裕次，第 54 回生物物理学会，つくば、2016/11/27

②1 種類の抗サバイピンバインダー（Three-Finger と VHH 抗体）のサバイピン阻害活性，安齋 宏紀、鈴木武尊、四本勇也、木村 慎之介、鈴木 美穂、久保 泰、根本 直人，第 39 回日本分子生物学会年会，横浜、2016/11/30

②2 X線 1 分子追跡（DXT）法による 7ニコチン性アセチルコリン受容体のリアルタイム 1 分子動態計測，馬場 知之、大橋 澄子、関口 博史、池崎 圭吾、三尾 和弘、佐々木 裕次、久保 泰，第 39 回日本分子生物学会年会，横浜、2016/12/02

②3 Modulated dynamics of PAM-7 nAChR from X-ray single molecular observations，馬場 知之、久保 泰、大橋澄子、池崎 圭吾、三尾 和弘、関口 博史、佐々木 裕次，Biophysical Society 61st Annual Meeting，New Orleans、2017 /02/14

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：膜に提示したタンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法
発明者：久保泰、木村忠史、小野世吾
権利者：産業技術総合研究所
種類：特願
番号：2014-110562
出願年月日：2014/05/28
国内外の別：国内

名称：核酸リンカー
発明者：久保泰、Naimuddin Mohammed
権利者：産業技術総合研究所
種類：特願
番号：2014-266738
出願年月日：2014/12/26
国内外の別：国内

名称：VEGF 結合性ペプチド
発明者：久保泰、Naimuddin Mohammed
権利者：産業技術総合研究所
種類：特願
番号：2014-266737
出願年月日：2014/12/26
国内外の別：国内

○取得状況（計 2 件）

名称：ポリペプチドライブラリーを調製する方法
発明者：久保泰、木村忠史、小野世吾
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：5717143
取得年月日：2015/03/27
国内外の別：国内

名称：膜に提示したタンパク質を特異的に認識するポリペプチドの調製方法
発明者：久保泰、木村忠史、小野世吾
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：5787298
取得年月日：2015/08/07
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
久保 泰 (KUBO, Tai)
産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・副研究センター長
研究者番号：10178030

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()