

# 新規生物活性ペプチドの取得を基盤とした医薬・マテリアルの開発

研究代表者 小出 隆規  
(先進理工学部 化学・生命化学科 教授)

## 1. 研究課題

生物活性を有するペプチドは、その高い標的特異性から医薬品のリード化合物として有用である。しかし、その一方で、生体内での易分解性の克服が課題である。また、ペプチド性リード化合物は、天然のリソースに大きく依存しており、人為的に構築されたランダムペプチドライブラリから得られたリードからの創薬成功例はいまだに少ない。

本研究では、上記問題を解決しうる、リード化合物の新規探索戦略の立案と方法論の開発を行う。すなわち、①優れた生体安定性を有するペプチドの骨格をあらかじめ選定し、②その骨格に固定されたランダムペプチドライブラリをコンビナトリアルな方法で構築し、③その中から高スループットで医薬品リードたり得るペプチドを取得する。

また、コラーゲン3重らせんを模倣するペプチドの理論的な分子デザインから、新しいアイデアに基づく創薬研究を展開する。加えて、生物活性を有するコラーゲン様3重らせんペプチドの高分子化、あるいは超分子化によって、新しいゲル状バイオマテリアルを創製し、医療への応用を目指す。

## 2. 主な研究成果

### 2.1 3重らせん型ランダムペプチドライブラリからの新規タンパク質結合ペプチドの探索

様々なコラーゲン結合タンパク質を標的としたライブラリからの探索を本格化した。血管新生阻害タンパク質である色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived factor, PEDF)を標的としたスクリーニングからは、天然のアミノ酸配列より高い結合親和性をもつ新規ペプチドが得られた。また、血液凝固因子である von Willebrand 因子に結合する3重らせん型ペプチドが得られている。プロコラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 に対しては、これまで知られている結合配列とは大きく異なるアミノ酸配列を有する新規ペプチドが多数得られた。

### 2.2 ヘテロキラルなランダムペプチドライブラリからモノクローナル抗体の mimotope を探索する方法の開発

昨年度に引き続き L/D アミノ酸が混在するヘテロキラルなランダムペプチドライブラリ [One-bead 2<sup>n</sup> Peptide (OB2<sup>n</sup>P) Library]からのスクリーニングの高感度化に取り組んだ。これまでに rolling circle amplification など、さまざまな方法で、ビーズに結合した標的タンパク質のシグナルの増幅を試みているが、期待されたほどの劇的な感度上昇はみられていない。今後は、現在までに達成された感度で可能なスクリーニングを実践しながら、問題点を抽出し、それらを改善していくことで、方法論としての確立を目指す。

### 2.3 人工コラーゲン様ポリマーの開発と医療への応用

すでに我々の研究グループは、化学合成した3重らせん型ペプチドポリマーを成分とする人工コラーゲンのバイオマテリアルとしての有用性を示してきた。これまでに、特に眼科領域での応用を目指した開発を実施してきたが、事前にポリマーを成型する必要性があり、また、一旦成型されたゲル状マテリアルは物理的破壊に対して不可逆であるという問題があった。そこで我々は、注射により目的とする患部に注入でき、かつ患部でゲル化する能力を有するインジェクタブルなポリマーの開発に着手した。

そのうちのひとつは、pH変化によるペプチド主鎖の分子骨格変換により、ゾルからゲルへと変化するペプチド性ポリマーである。このポリマーは酸性ではゾルであり、注射器にて注入可能である。生理的pH(弱アルカリ性)では速やかにペプチドの骨格変換反応が進行し、それに伴う3重らせん形成によりゲル化する。この人工コラーゲンをを用いて細胞の三次元ゲル内培養が実現され、イヌ尿管上皮細胞MDCK細胞のcyst形成を誘導することが可能であることを示した(図1)。

もうひとつは、分岐状コラーゲン様ペプチドの3重らせん形成に伴う分子間集合による超分子化である。このようにして作成されるゲルは圧感応性であり、注射器により射出が可能であるとともに、圧から解放されることでゲルを再生する。これまでに、ペプチドの基本的分子デザインを決定し、現在は医療に応用可能な安定性を示すペプチド組成の探索を行っている。

### 2.4 コラーゲン3重らせんの熱安定性が環境温度に適応する分子メカニズム

一般にタンパク質の立体構造の熱安定性は遺伝的に規定されておりそれぞれに固有である。しかし、コラーゲンの3重らせん構造の熱安定性には、ポリペプチドが合成されたのちの翻訳後修飾の影響が大きいことが分かっていた。我々は、変温動物であるゼブラフィッシュの細胞を用いて、異なる温度で培養することにより、異なる構造熱安定性を持つコラーゲンが分泌されることを明らかにした。また、このようなコラーゲン3重らせん構造の熱適応は、翻訳後修飾の調節と、3本鎖を形成する $\alpha$ 鎖の組成の変化によるものであることを明らかにした(図2)。この知見は、ヒト型コラーゲンの遺伝子組換え生産に重要な示唆を与えるものである。

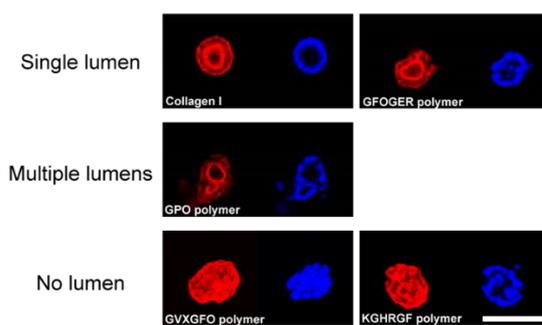


図1 天然コラーゲンおよび人工コラーゲンゲル中で形成したMDCK細胞塊  
人工コラーゲン中に導入した生物活性アミノ酸配列の種類により囊胞(cyst)形成が異なる。  
(赤)アクチン、(青)核

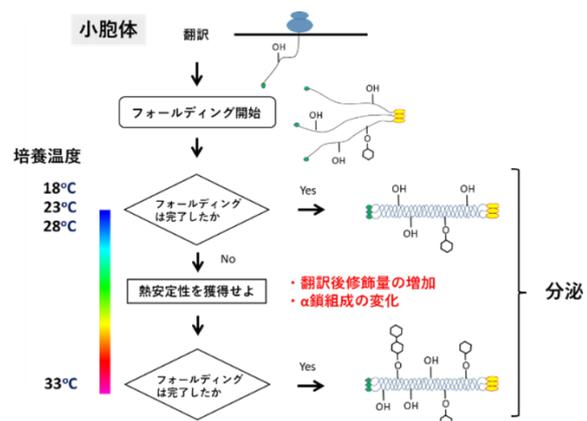


図2. プロコラーゲン3重らせん構造は小胞体内腔において環境温度に応じた熱安定性を獲得する

### 3. 共同研究者

増田 亮 (理工総研 次席研究員)

市瀬慎一郎 (理工総研 招聘研究員)

能勢 博 (理工総研 招聘研究員)

### 4. 研究業績

#### 4.1 学術論文

S.F. Ichise, T. Koide

Synthetic Collagen-like Polymer That Undergoes a Sol-Gel Transition Triggered by *O-N* Acyl Migration at Physiological pH.

*Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1584 (2022), doi: 10.3390/ijms23031584.

K.K. Fujii, Y. Taga, Y.K. Takagi, R. Masuda, S. Hattori, T. Koide

The Thermal Stability of the Collagen Triple Helix Is Tuned According to the Environmental Temperature.

*Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2040 (2022), doi: 10.3390/ijms23042040.

#### 4.2 特許

小出隆規, 市瀬慎一郎, 能勢博

「NOBEL PEPTIDES」特願 2021-215376

#### 4.3 学会および社会的活動

日本結合組織学会 理事

日本ペプチド学会 理事

第 58 回ペプチド討論会 (八王子) 運営委員

### 5. 研究活動の課題と展望

3 重らせん型ランダムペプチドライブラリからの創薬リードの探索は、規模を拡大して引き続き実施し、優れた生物活性を有する新規な 3 重らせんペプチドの取得を目指す。また、二次スクリーニングとしてペプチド中の一部のアミノ酸を固定したフォーカスライブラリからの探索を行い、より高活性なペプチドを取得する。さらに、標的をコラーゲン結合タンパク質以外のタンパク質にも拡張する。

ヘテロキラルな生物活性ペプチドの取得を目指した OB2<sup>®</sup>P ライブラリからの探索においては、適用例数を増やしその有用性を示しつつ、さらなる高感度化を図る。

人工コラーゲン様マテリアルの応用についても、引き続き眼科領域の疾患治療への適用を目指してペプチド性超分子・高分子の開発を行う。特に、容易に眼内に注入して使用できるインジェクタブルゲルについての検討を重点的に行う。