

生物活性を有する 3 重らせんペプチドの探索

研究代表者 増田 亮
(理工学術院総合研究所 次席研究員)

1. 研究課題

ペプチドは小分子医薬品と抗体医薬の中間に位置する分子量を持つことから、両者の利点を併せ持つ中分子医薬品としての利用が期待されている。しかし、一般的なペプチドは体内のプロテアーゼによって容易に分解されてしまうため、医薬品としての応用が困難であった。所属研究室では近年、3 重らせんペプチドがプロテアーゼによる分解に強く抵抗することを見出した (Yasui, H. *et al. Biopolymers*, 2013; Koide, T. *et al. Biol. Pham. Bull.* 2016)。3 重らせんペプチドはコラーゲン様の 3 重らせん構造を形成するペプチドである。本研究では、医薬品リードとなる 3 重らせんペプチドを探索するための手法の確立を目指す。

2. 主な研究成果

本年度は、生物活性を有する 3 重らせんペプチドを効率的にスクリーニングするためのシステム開発に注力した。そのためのシステムとして、酵母・2-ハイブリッド法を利用することとした。

2.1 ランダム配列を有する 3 重らせんペプチド酵母ライブラリの構築

これまでに、本代表者は 3 重らせんペプチドライブラリとして、 10^2 の多様性を有する両親媒性コンビナトリアルライブラリを化学的に構築し、その中から抗菌性ペプチドを取得している (Masuda *et al. Biopolymers*, 2016, 106, 453; Masuda *et al. Biopolymers*, 2017, 108, e22931)。本研究では、ライブラリ中に含まれる 3 重らせんペプチドの多様性を上げるために生物発現系である酵母を利用することとした。3 重らせんペプチドの配列中にランダム配列となる領域を一部組み込んだコンストラクトを作製し、それをもちいてペプチドを酵母に発現させた。その結果、従来のライブラリより多様性が 10^4 倍拡大した 10^6 の多様性を有する 3 重らせんペプチドのライブラリを構築することができた。

2.2 次世代シーケンサーによる 3 重らせんペプチド酵母ライブラリのランダム領域の分布の調査

構築した 3 重らせんペプチドライブラリのランダム領域のアミノ酸分布を調査するため、次世代シーケンサーによる解析を行った。選択プレート上に酵母ライブラリを撒き、生えてきたコロニーからプラスミドを回収した。そのプラスミドに PCR をかけることで次世代シーケンサー用のライブラリを調製し、それらのランダム領域部分のアミノ酸配列を解析した。次世代シーケンサーで読まれた総 read 数は 118,611 であった。得られた結果を理論的な分布と比較すると、ほぼ一致する結果となった (Fig. 1)。さらに、天然コラーゲン中に含まれるアミノ酸分布と比較してみると、ライブラリ中に含まれるアミノ酸配列はコラーゲン中に含まれるものよりも多様であることがわかった (Fig. 2)。

構築した酵母 3 重らせんペプチドライブラリをもちいて、種々のコラーゲン結合タンパク質に対するスクリーニングを行った。スクリーニング結果を Table 1 にまとめた。DNA シークエンサーや次世代シークエンサーにてランダム領域の配列を調査したところ、それぞれのタンパク質に対して特定のアミノ酸が濃縮される結果を得た。さらに、それらの内の一部の標的特異性を確認したところ、標的タンパク質以外には酵母-2-ハイブリッド相互作用を起こさないこともわかった。



Fig.1 次世代シーケンサーによるライブラリ内の 3 重らせんペプチドのランダム領域の一部のアミノ酸分布。左が解析した結果、右がランダム配列の理論的な分布。各文字はアミノ酸の 1 文字表記、その大きさは出現頻度を表す。*は終始コドンを示す。

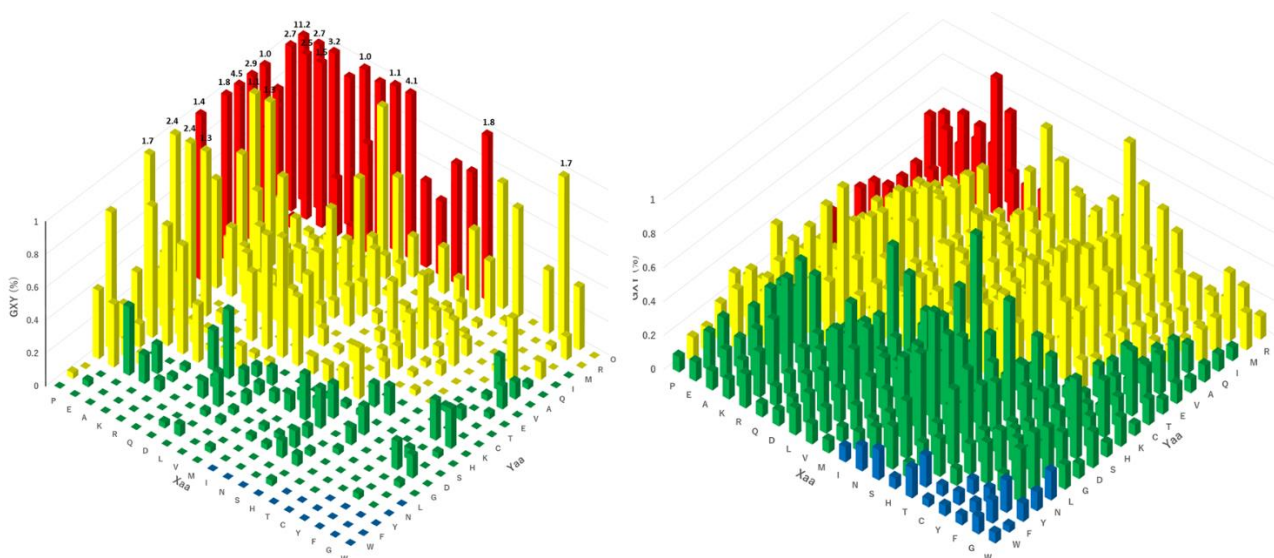


Fig.2 天然コラーゲンとライブラリ内の 3 重らせんペプチドのランダム領域のアミノ酸分布。左が天然コラーゲン、右がライブラリのランダム配列の分布。x 軸と y 軸は、ランダム領域の所定の位置におけるアミノ酸の配置、z 軸は出現率を表している。バーの色は、3 重らせん構造の安定化度合いを示す（赤>黄>緑>青の順に熱安定性が高い）。

Table 1 スクリーニングの結果のまとめ

標的タンパク質	Mated 酵母数	コロニー数
integrin α 1I	2.0×10^5	72
integrin α 2I	4.1×10^5	~500
PEDF	5.7×10^5	4
VWF-A3	4.0×10^5	2

3. 共同研究者

小出 隆規（理工学部・化学科・教授）

4. 研究業績

4.1 学術論文

Kanai S., Machida K., Masuda R., Koide T. “Peptide precursors that acquire denatured collagen-hybridizing ability by O-to-N acyl migration at physiological pH” *Org. Biomol. Chem.* 18, 2823-2827 (2020)

Ichise S.F., Takeuchi S., Aoki S., Kuroda K.C., Nose H., Masuda R., Koide T. “Development of a collagen-like peptide polymer via end-to-end disulfide cross-linking and its application as a biomaterial.” *Acta Biomaterialia*. 94, 361-371 (2019)

Udagawa H., Yoneda T.H., Masuda R., Koide T. “A Strategy for Discovering Heterochiral Bioactive Peptides by Using the OB2nP Library and SPOTs Method.” *ChemBioChem*. 20, 2070-2073 (2019)

4.3 招待講演

4.4 受賞・表彰

4.5 学会および社会的活動

増田亮、富永裕貴、門之園哲哉、小出隆規「コラーゲン結合タンパク質に結合する 3 重らせん配列を取得する酵母-2-ハイブリッドシステムの確立」 東京, 第 51 回結合組織学会学術大会, 2019.5

5. 研究活動の課題と展望

現在、スクリーニングの結果得られたコロニーから取得された配列を含む 3 重らせんペプチドの化学合成を行っている。これらのペプチドをもちいて、プルダウンアッセイや ELISA をもちいて、標的タンパク質との結合を *in vitro* で評価する。また、標的とするコラーゲンタンパク質も拡大してスクリーニングを行っていくことで、本システムの有用性を実証していく。