

生物活性を有する 3 重らせんペプチドの酵母内ランダムペプチドライブラリ からのスクリーニング

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

これまでに医薬品として、小分子化合物および抗体が広く用いられてきた。それらにはそれぞれ、大量に安定して供給できる点および標的分子に対する高い親和性や選択性を発揮できる点が利点としてある。小分子化合物と抗体の中間の分子量を有するペプチドは、これらの利点を両立できるポテンシャルを持つことから医薬品として有望な分子である。一方で、一般的なペプチドには生体内で酵素によって容易に分解されてしまう弱点が存在する。

申請者は、その弱点を克服したペプチドとしてコラーゲン様の 3 重らせん構造を形成するペプチド、3 重らせんペプチドを利用した創薬研究を展開してきた。これまでに、申請者が所属していた研究室において、血中や消化管内に投与した 3 重らせんペプチドはほぼ分解を受けずに、尿中や糞便中に排泄されることを見出している。一方で、人工的に生物活性を付与した 3 重らせんペプチドが開発された例はほとんどなかった。

これまでに申請者は、生物活性を有する 3 重らせんペプチドを効率的に取得する方法を確立するため研究を行ってきた。その過程で、酵母-2-ハイブリッド法を利用して、酵母内に構築したランダムな 3 重らせんのライブラリから、タンパク質に結合するペプチドを選択する方法を構築した。本報告では、標的としたタンパク質ごとに、本方法を使用した結果についてまとめる。

2. 主な研究成果

① 色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF)

PEDF は強力な血管新生阻害作用を有するタンパク質であり、PEDF を投与した担がんマウスではがんの増殖が有意に抑制されることが知られている。

ランダムな 3 重らせんペプチドライブラリから PEDF に結合する 3 重らせんペプチドの選択を行った結果、14 種類の新規配列を取得した。これらの配列を含む 3 重らせんペプチドを化学合成し、コラーゲン上の PEDF 結合配列を含むペプチドとともに PEDF に対する結合親和性を評価したところ、新規に取得した配列の中には天然の配列よりも強く PEDF に結合する配列が見出された。

また、天然の PEDF 結合配列は細胞膜上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) にも結合することが知られている。これまでに PEDF あるいは HSPG に選択的に結合する 3 重らせん上の配列は知られていない。そこで、新規に取得した PEDF 結合配列の HSPG に対する結合親和性を評価し、それぞれの分子に対して選択的に結合するペプチドを開発するための構造活性相関研究を展開した。その結果、天然の結合配列よりも PEDF あるいは HSPG に対し

て、より高い選択性を示す 3 重らせん上の結合配列を見出すことができた。

② コラーゲン結合性インテグリン $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$

細胞膜上に発現するインテグリンはコラーゲンに結合することで、細胞の接着や伸展、分化を誘導する。コラーゲン結合性のインテグリンとしては、 $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 10\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$ の 4 種類が知られており、それらは Glu を含むコラーゲン上の共通の配列を金属イオン依存的に認識することが知られている。本研究では、それぞれのインテグリンに選択的に結合する 3 重らせん上のアミノ酸配列の取得を目指した。

まず、インテグリン $\alpha 1\beta 1$ に結合するペプチドをランダムな 3 重らせんペプチドライブラリから探索したところ、コラーゲン上の天然結合配列で見られるように、Glu が特定位置に濃縮される結果を得た。一方で、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ に結合するペプチドの探索では、興味深いことに Glu を含まない配列も複数取得された。これらの配列には金属イオンに配位できるアミノ酸が含まれていなかったことから、金属イオン非依存的な結合様式の存在が示唆された。In vitro の実験において、この配列を含む 3 重らせんペプチドが金属イオン非依存的にインテグリン $\alpha 2\beta 1$ に結合している様子が観察された。さらにこの配列は、その他 3 種のコラーゲン結合性インテグリンである $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 10\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$ には結合しなかった。これらの結果は、インテグリン $\alpha 1\beta 1$ あるいはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ への結合特異性を有した 3 重らせん上のアミノ酸配列が存在することを示唆している。

③ フォンヴィルブランド因子(von Willebrand factor, VWF)とエジブチン

VWF は血液中に存在する血液凝固因子で、血管が破れコラーゲンが露出すると、コラーゲン上で凝集し止血が生じる。一方でカの唾液に含まれるエジブチンは、コラーゲン上の VWF 結合部位に競合的に結合することで、血液の凝固を阻害する。本研究では、VWF あるいはエジブチンを標的として、それぞれに結合する 3 重らせんペプチドの選択を行った。

その結果、それぞれを標的とした選択において、異なる傾向を有するアミノ酸配列が濃縮された。In vitro の実験において、これらの配列を含む 3 重らせんペプチドの標的に対する結合を評価したところ、天然の結合配列よりも強い結合親和性を示した。

3. 共同研究者

小出隆規 (先進理工学部・教授)

4. 研究業績

4.1 学術論文

R. Masuda, K.P.P. Thant, K. Kawahara, H. Oki, T. Kadonosono, Y. Kobayashi, T. Koide
A yeast two-hybrid system to obtain triple-helical ligands from combinatorial random peptide libraries.
bioRxiv 567114 (2023)

5. 研究活動の課題と展望

本研究で確立したタンパク質結合性 3 重らせんペプチドの取得法の標的となるタンパク質は、コラーゲン結合性タンパク質に限定されない。今後は、標的タンパク質を拡大して、生

物活性ペプチドの取得を目指していく。

また取得された配列を有する 3 重らせんペプチドには、いずれも標的タンパク質に対して高い結合親和性や結合選択性を有するものが見出された。これらは医薬品候補となる可能性があるため、生物活性を評価していく。