

研究報告書

「創発的機能制御性ペプチドアプタマーの創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 和田 章

1. 研究のねらい

近年、抗体に匹敵する標的結合性を獲得したペプチドを人工的に作製する手法として「ファージディスプレイ法」が開発され、ペプチドライブラリーから標的分子に対して特異的に結合する“ペプチドアプタマー”を自在に創出する道が開かれたように見えた。しかし、この手法では、標的分子とファージ本体との立体障害が大きいだけでなく、ホストの大腸菌の生活環に影響するペプチドは自動的に排除されてしまうため、実際に利用しているペプチドライブラリーの多様性は小さい($10^7 \sim 10^8$ 種類)など、改善すべき問題は数多く残されている。そこで、生細胞を使用することなく、ペプチドアプタマーを試験管内で選択する「ポリソームディスプレイ法」および「mRNAディスプレイ法」の原理が新たに提案され、表現型と遺伝子型の対応付けの方法やペプチドライブラリーの拡大($10^{10} \sim 10^{12}$ 種類)などの検討が可能となってきた。しかしながら、目的のペプチドアプタマーを試験管内で自在に創出できる研究者は、世界的に見ても数が少ない。特に、小規模化・高速化に最も適していると考えられるリボソームディスプレイ法の報告例が極端に少ないのは、「ペプチド-リボソーム-mRNA複合体」の合成および選択操作・条件設定などの難しさにある。

そこで、本研究では、その複合体の超安定化を実現すると共に、天然アミノ酸だけでなく、化学的に機能化した非天然アミノ酸を部位特異的に導入したペプチドライブラリーを構築し、その中から目的・用途に最適なペプチドアプタマーを選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の開発に取り組んだ。そして、本手法を駆使することで、タンパク質や細胞の特定機能を模倣・発現・賦与・検出・探索する「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成し、独自の“ペプチド・バイオテクノロジー”の確立と本領域から世界へと発信することがねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、試験管内タンパク質合成システムにより、天然アミノ酸だけでなく、機能化アミノ酸で構成した人工ペプチドの集団(人工ペプチドライブラリー)を構築すると共に、その中から標的分子に特異的に結合する“次世代のペプチドアプタマー”を選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法(図 1)」を独自に開発した。そして、本手法を駆使することで、抗体に匹敵する標的結合性を獲得した「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」を創成したことを足掛かりに、金属酵素の機能と構造を規範として、特定の生体反応を触媒する「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成、細胞機能を誘導する生理活性タンパク質を自己集積させる「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成、標的タンパク質の構造情報を光シグナルへと

変換する「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成が可能となった。さらに、ペプチドライブラリーをタンパク質ライブラリーへと拡張したりリボソームディスプレイ法により、生物活性化化合物や創薬候補の標的タンパク質を正確かつ迅速に同定する創薬技術の基礎を確立するまでに至っている。

つまり、本研究とは、ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発と利用により、様々な異種分子(金属イオン・生体材料・生理活性因子・蛍光分子・生物活性化化合物など)と融合して働く「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成すると共に、標的タンパク質および標的細胞の特定機能を“ペプチド”により再現する／制御する「ペプチド・バイオテクノロジー」の独自開拓を目指した取り組みと定義できる。

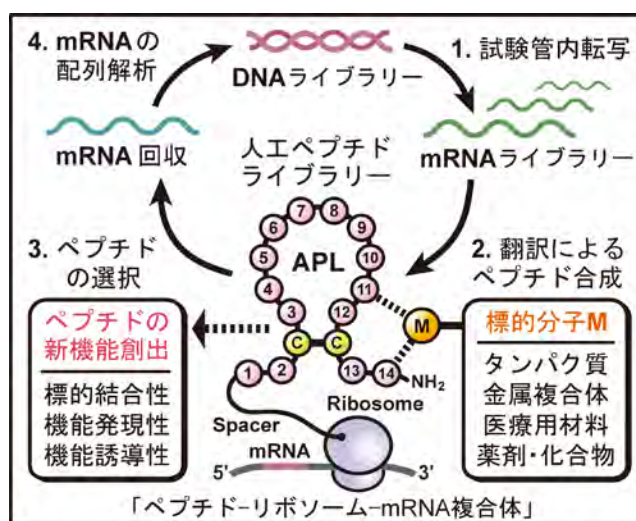


図1. ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発

(2) 詳細

2-1: 「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」の創成

抗体は、相補性決定領域CDR (Complementarity Determining Region)のアミノ酸配列をランダムに変化させることで、様々な抗原と結合することを可能にしている。そこで、抗体の抗原認識のように、任意の標的分子と特異的に結合できるペプチド(ペプチドアプタマー)を創成するため、抗体のCDRの長さとしるべ構造を模倣するだけでなく、実際の抗原認識に利用されるアミノ酸の出現確率を考慮した“抗体CDR様ペプチドライブラリー”を構築した。そして、そのペプチドライブラリーを提示させた安定型リボソームディスプレイ法を利用することで、標的タンパク質(Avidin)に対して結合する新規ペプチドアプタマーの選択と同定を行った。その結果、これまでに報告例のない新たなアミノ酸配列を有するペプチドを見出すことができた。さらに、その標的タンパク質に対する結合性を速度論的に解析したところ、抗体に匹敵するnMオーダーの解離定数 K_D を有する高親和性ペプチドアプタマーであることが明らかとなった。つまり、これらの結果は、本研究におけるペプチドアプタマーの模倣的設計と安定型リボソームディスプレイ法の有用性を示している。

2-2: 「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成

生体内に存在する金属酵素が反応活性を発現するためには、金属イオンへの配位によって活性化した反応活性種と標的となる基質が適切に配向する“空間反応場の構築”が必要不可欠である。つまり、「金属イオン-反応活性種-標的基質」で構成される空間反応場を再現・構築できるペプチドは、金属酵素様活性を発現することが期待できる。そこで、RNA のリン酸エステル部位を加水分解する亜鉛含有酵素の機能と構造に着目し、「亜鉛イオン-ヒドロキソ活性種-リン酸エステル基質」の反応場アナログとしての金属錯体に結合するペプチドアプタ

マーの創成に取り組んだ(つまり、ペプチドの反応場アナログへの結合活性(反応場を構築する活性)を反応活性へと変換できることを、実際に金属酵素様活性ペプチドアプタマーを創成することで証明する)。その結果、今回見出したペプチド P1 のアミノ酸配列は、金属酵素の活性中心構造に必須のアミノ酸群(His, Arg 等)を豊富に有しているだけでなく、標的分子である金属錯体に対して高い親和性を示すことが判明した。さらに、亜鉛(Zn)イオンと複合体を形成することで、一本鎖 RNA 基質のリン酸エステル部位を加水分解する「リボヌクレアーゼ(RNase)活性」を発現することも明らかとなった(図 2)。特に、このリボヌクレアーゼ活性は、ペプチドのアミノ酸配列・環状構造・金属イオンの種類・pH に依存しており、天然の金属酵素と類似した特徴を有していたことから、本研究が提案する金属酵素様活性ペプチドアプタマー創成戦略の正当性を実証するものとなった。

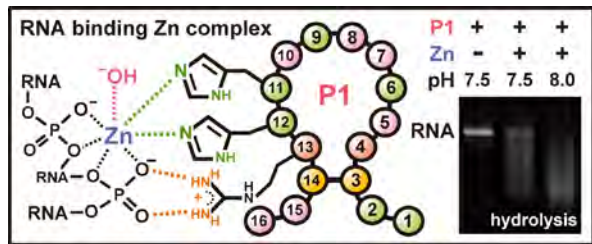


図2. Zn-P1複合体のRNase活性の電気泳動評価

2-3:「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成

近年、免疫原性が低く、物理的強度と可塑性に優れた金属である“チタン”は、医療用機器部品・インプラント材料として汎用されている。一方、次世代医療に求められるバイオマテリアルの創製においては、それら材料表面に接する細胞・組織の微小環境・クロストークを時空間的に制御する“革新的表面修飾技術”の開発が期待されている。そこで今回、ハイブリッド型リボソームディスプレイ法を利用することで、望みの細胞機能を誘導する生理活性因子を金属材料表面に自己集積させるペプチドアプタマーを創成し、目的に対応した細胞機能誘導性金属材料の創製に取り組んだ。まず、本手法を駆使することで、標的分子としてのチタン製ナノ粒子に結合するペプチドアプタマーの選択と同定を試みたところ、天然には存在しない特有のアミノ酸配列を有すると共に、チタン表面に対して高親和性を示す「チタン表面吸着性ペプチドアプタマー(TOP1)」であることが判明した。さらに、このペプチドアプタマーとヒト上皮細胞成長因子 EGF を融合した人工タンパク質(TOP1-EGF)は、チタン表面に対して自発的に吸着するだけでなく、様々な哺乳類細胞(繊維芽細胞など)の接着を促進すると同時に、細胞の増殖・伸展を能動的に誘導する機能を発現することが明らかとなった(図 3)。つまり、これらの結果は、ペプチドアプタマーを介して金属表面に自己集積した活性型 EGF により、細胞増殖機能が持続的に誘導されたことを示しており、将来の細胞機能誘導性材料のテイラーメイド創製に貢献できるものと期待している。

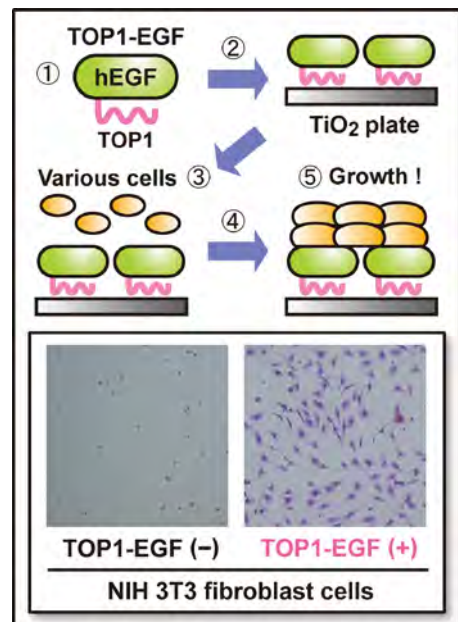


図3. TOP1-EGFのチタン表面における自己集積化と細胞増殖誘導性の発現

2-4:「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成

生命分子が複雑に絡み合って生じる生命現象を定量的に理解するためには、標的となる分

子の構造変化や相互作用を直接的に検出・追跡できる革新的バイオセンサーの開発が必要不可欠である。そこで、生命分子の構造情報を光シグナルへと変換するバイオセンサーとしてのペプチドアダプターを創成するため、様々な蛍光分子を化学的に修飾した蛍光性アミノ酸-tRNA を合成し、それら蛍光性アミノ酸を部位特異的に組み込むための試験管内タンパク質合成システムを構築した。そして、そのシステムにより駆動するハイブリッド型リボソームディスプレイ法を利用して、標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルとして検出する「標的応答型蛍光性ペプチドアダプター」の創成に取り組んだ。ここでは、カルシウム濃度に依存して構造を変化させることで、細胞内シグナル伝達系の重要な役割を果たすカルモジュリン(CaM)に着目し、カルシウムイオンに結合したカルモジュリンの立体構造だけを特異的に認識するペプチドアダプターの選択と同定を試みた。その結果、今回見出された新規ペプチド(CaMP)は、標的であるカルシウム結合型カルモジュリンの立体構造に対して特異的に結合するだけでなく、その分子認識の情報を蛍光分子 TMR 由来の蛍光シグナルとして検出するバイオセンサー機能を発揮することが明らかとなった(図4)。今後は、望みの標的分子に結合するペプチドアダプターをオンリーワン・バイオセンサーとして創出できる汎用的なシステムにまで発展させることを検討している。

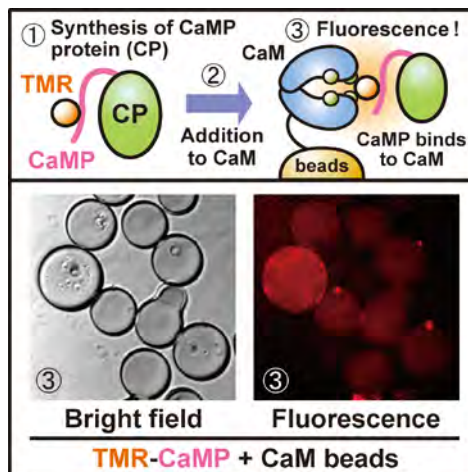


図4. CaMPによる標的構造の蛍光検出

2-5:「化合物結合性タンパク質探索システム」の構築

現在、ケミカルバイオロジーを基盤とする創薬研究では、副作用が小さく、薬理効果の高い分子標的薬を発掘するため、大規模な化合物ライブラリーのスクリーニングが細胞レベル／動物レベルで展開されている。そして、特定の細胞機能を制御する生物活性化合物を創薬シーズとして見出し、医薬品へと開発するためには、その化合物が結合する標的タンパク質を正確かつ網羅的に同定し、それらの生体内における作用機序と副作用を解明することが必須となっている。そこで、上記の喫緊のニーズに応える創薬基盤技術を独自に開発するため、ペプチドライブラリーからタンパク質ライブラリーへと拡張したハイブリッド型リボソームディスプレイ法を設計し、薬剤・生物活性化合物と結合する標的タンパク質を迅速に同定する「化合物結合性タンパク質探索システム」を新規に構築した。そして今回、小規模ではあるが完全長ヒトタンパク質ライブラリーモデルを合成すると共に、免疫抑制剤として利用されている FK506 を光架橋反応により固定化した化合物ビーズを利用して、その薬剤に結合する標的タンパク質の探索と同定を試みた。その結果、FK506 の標的タンパク質である FKBP12 を正確かつ短時間で同定することに成功した。今後は、完全長ヒトタンパク質ライブラリーを更に拡充すると共に、新たに発掘される生物活性化合物や薬剤候補の標的タンパク質を探索・同定することで、革新的創薬基盤技術としての本システムの有用性を実証していく計画である。

3. 今後の展開

本研究では、試験管内タンパク質合成システムで駆動する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」

プレイ法」を新規に開発することで、天然アミノ酸で構成されるペプチドアプタマーだけでなく、化学的に機能化した非天然アミノ酸を部位特異的に導入したペプチドアプタマーを創成することが可能となった。そして、実際に本手法を利用することで、「抗体様分子認識機能、金属酵素様触媒、細胞機能誘導性材料、光バイオセンシング素子の開発を可能にするペプチドアプタマーの創成とそれらの機能解析」に成功した。

今後の展望としては、上記の研究成果を基盤として、ペプチドアプタマーの更なる可能性を発掘し、ペプチド・バイオテクノロジーの有用性を発信し続けるため、実際の細胞内・生体内において働くことができる次世代のペプチドアプタマーを創成し、ペプチドの創薬シーズ・人工酵素・医療用インプラント材料・疾患診断用プローブ・創薬基盤技術などの応用開発へと展開していく。そして、生命科学・分子生物学などの学術研究から環境・創薬・医療産業に至る幅広い領域において貢献する「ペプチドアプタマーの科学と技術」を開拓していきたい。

4. 自己評価

本研究では、任意の標的分子に対して特異的に結合するアプタマー機能と共に、異種分子との融合により初めて発現する機能を獲得した“次世代のペプチドアプタマー”を創成するため、試験管内タンパク質合成システムで駆動する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の考案と開発に取り組んだ。これにより、従来のファージディスプレイ法では獲得することが困難であった高親和性ペプチドアプタマーとしての「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー(2-1)」の創成を皮切りに、「金属酵素様活性ペプチドアプタマー(2-2)」の創成では、金属酵素の機能と構造を再現することで、特定の生体反応を触媒するペプチドアプタマーを創り出す戦略を新たに提案・実証することができた。

さらに、「材料表面吸着性ペプチドアプタマー(2-3)」の創成では、そのペプチドアプタマーと細胞機能を誘導する生理活性タンパク質を融合するだけで、希望の細胞機能制御性材料を簡便に創製できることを証明した。また、「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー(2-4)」の創成では、機能化アミノ酸をペプチドライブラリーに導入する試験管内タンパク質合成システムの構築とそれにより駆動するハイブリッド型リボソームディスプレイ法を開発して、標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルへと変換するバイオセンサーとしてのペプチドアプタマーを創出するスキームを確立することができた。

一方、これまでの低分子量ペプチドを高分子量タンパク質にまで拡張したライブラリーを新たに合成する共に、そのタンパク質ライブラリーを組み込んだハイブリッド型リボソームディスプレイ法(2-5)を開発することで、薬剤や生物活性化応物の標的タンパク質を正確かつ迅速に探索・同定できるシステムとして確立するに至っている。

以上、本研究において独自に開発したバイオテクノロジーとそれにより創出した新規ペプチド群は、国内外における研究発表だけでなく特許としても出願しており、将来のペプチドアプタマーを利用した“分子標的薬・生体触媒・医療用マテリアル・センシングデバイス・創薬支援システム”などの開発を実現する学術的応用研究の創出と共に、産業界との連携も視野に入れて取り組むことができた。そして最後に、近い将来、本研究成果を新たな出発点とし、ペプチドアプタマーの基礎研究から応用研究そして実用化へと導くことができれば、本研究の真の目標は達成されるものと信じている。

5. 研究総括の見解

本研究は、従来困難であった「ペプチド-リボソーム-mRNA 複合体」の安定化を実現することによってペプチドライブラリーを構築し、その中から目的・用途に応じたペプチドアプタマーを選択・同定する「ハイブリッド型リボソームディスプレイ法」の開発を目標としている。本手法を用いることによって、タンパク質や細胞の特定機能を模倣・発現・賦与・検出・探索する「創発的機能制御性ペプチドアプタマー」を創成し、“ペプチド・バイオテクノロジー”なる学問の確立をめざしている。

研究の結果、①従来困難であった高親和性ペプチドアプタマーとしての「抗体 CDR 様活性ペプチドアプタマー」の創成、②「金属酵素様活性ペプチドアプタマー」の創成、③希望とする細胞機能制御性材料を創製できる「材料表面吸着性ペプチドアプタマー」の創成、④標的タンパク質の構造変化を蛍光シグナルへ変換する「標的応答型蛍光性ペプチドアプタマー」の創成、⑤薬剤や標的タンパク質を正確かつ迅速に探索・同定できるシステム-ハイブリッド型リボソームディスプレイ法の開発、といった数々の目覚ましい成果を挙げた。

これら新規ペプチド群とその創出システムは、独自性の高い優れた成果であると評価できる。将来、これらのペプチドアプタマーを利用した“医療用マテリアル・センシングデバイス・創薬支援システム”といった一連のバイオテクノロジーの開発につながる可能性があり、「さきがけ」にふさわしい先進的、先導的研究といえることができる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. A. Wada, “Development of Next-generation Peptide Binders using *In Vitro* Display Technologies and Their Potential Applications”, *Front. Immunol. (Research Topic)*, **2013**, in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1.

発 明 者: Akira Wada, Hiroyuki Osada

発明の名称: Nucleic acid construction, nucleic acid-protein complex and use thereof

出 願 人: 独立行政法人 理化学研究所

出 願 日: 2012/5/23

出 願 番 号: PCT/JP2012/63221

2.

発 明 者: Akira Wada, Yoshihiro Ito, Takashi Kitajima

発明の名称: Method of selecting polypeptide sequence, and metal oxide or silicon containing compound binding peptide and use thereof

出 願 人: 独立行政法人 理化学研究所

出 願 日: 2012/9/11

出 願 番 号: US: 13/608052, EP: 11753490.9, JP: 2012-504544

3.

発 明 者: 和田 章、長田 裕之

発明の名称: 核酸構築物、核酸-蛋白質複合体、及びその利用

出 願 人: 独立行政法人 理化学研究所

出 願 日: 2011/5/23

出 願 番 号: 特願 2011-115166

4.

発 明 者: 和田 章、伊藤 嘉浩、北嶋 隆

発明の名称: ポリペプチド配列の選択方法、並びに金属酸化物または
含珪素化合物結合ペプチドおよびその利用

出 願 人: 独立行政法人 理化学研究所

出 願 日: 2010/3/11

出 願 番 号: 特願 2010-054927

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1.

和田 章

「ペプチド・バイオテクノロジーの開発から生体機能性金属材料の創製へ」

第 43 回 中部化学関係学協会支部連合 秋季大会

「特別討論会:21 世紀をリードする無機化学」、

名古屋工業大学 (愛知)、2012 年 11 月 (依頼講演)

2.

和田 章

「新規バイオディスプレイ法の開発によるアプタマー・バイオエンジニアリングの展開」

CREST シンポ:トップダウンとボトムアップの融合によるナノ構造の作製と新機能発現

東京大学 (東京)、2011 年 10 月 (招待講演)

3.

Akira Wada

“ Development of Next-Generation Ribosome Display Technologies ”

3rd Annual International Congress of Antibodies 2011,

China National Convention Center (Beijing, China), Mar. 2011 (Invited talk)

4.

和田 章

「模倣的設計と進化的選択による人工生命分子の創成」

理研シンポジウム:統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開、

理化学研究所 (埼玉)、2010 年 8 月 (招待講演)



5.

和田 章

「ペプチド・バイオテクノロジーを切り拓く研究者」

理研ニュース 2011 年 2 月号「FACE」

(http://www.riken.jp/r-world/info/release/news/2011/feb/fac_01.html)