

# 人工コアのファージ上での分子進化

瀧 真清<sup>1\*</sup>・伊東 祐二<sup>2</sup>

近年、生物を用いて作製される「生物学的製剤」(英語ではbiologicsまたはbiopharmaceutics)と呼ばれる薬剤分子が脚光を浴びており、抗体医薬品に代表される分子標的薬としての作用機序で頻繁に用いられている。一方で生物学的製剤と同等の分子標的薬を安価かつ簡便に化学合成できるため、ペプチドや核酸アプタマーの取得が試みられてきた。天然型モノマーを重合させて作製されるこれら中分子は、体内での安定性や免疫系からの認識、標的分子との結合能などに問題が生じることも多い。そのため、ごく最近では非天然型ペプチドや修飾核酸・ペプチド核酸などのネオバイオ分子を用いた分子標的薬の取得が盛んになってきている。

このような背景の下、筆者らは、天然型分子が持ち得ない人工分子を中心(コア)にしてその特性を活かしつつ、ランダム化させたペプチドを用いてコアの周辺構造を最適化し、抗体の特徴である分子標的能を併せ持つハイブリッド型分子の取得を試みている。

## ファージウィルス上での反応：10BASE<sub>d</sub>-T法<sup>1)</sup>

まず、標的タンパク質へ相互作用するとともに何らかの物性が期待できる人工コアを合理的設計(rational designing)する。次に、コアの周辺構造を最適化するため人工コアとT7ファージに提示させたライブラリーペプチドとを結合させる(図1)。その際T7ファージ本体の、システイン(SH基)を含むすべての分子に副反

応することなく、Gp10タンパク質上に提示させたペプチドに出現するSH基のみに特異的かつ定量的に人工コアを共有結合できる(Gp10 based-thioetherification; 10BASE<sub>d</sub>-T)<sup>注)</sup>。

本手法にて、T7ファージの大腸菌への感染能を低下させることなく遺伝情報を保持したまま、さまざまな人工コアをライブラリー化することができる。あとはファージディスプレイ法の要領にて、標的タンパク質だけに結合する分子を選択(セレクション)すれば分子進化が可能になる。いくつかの実施例を以下に紹介する。

## 実施例1：蛍光コアの分子進化<sup>2)</sup>

抗体は極少量で種々の標的タンパク質を特異的に検出できるため医療現場にて汎用されているが、検出にはELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法やウェスタンブロット法などの煩雑な操作が必要である。さらに抗体は稀少であるため、抗体の優れた特性を保持したまま標的の即時検出が可能である安価な代替物質の開発が望まれる。筆者らは蛍光コアとしてソルバトクロミック色素を用い、その周辺構造を分子進化により最適化することで、標的タンパク質のみに特異的に結合し、蛍光検出が可能な人工分子を取得できるものと考えた。具体的にはprodan型コアを進化させることで、標的タンパク質に結合することで蛍光色が黄色から青色に変わり、なおかつ蛍光強度が顕著に増大するセンサー型分子の取得を試みた。

T7ファージディスプレイ法の操作に基づき5ラウンドのバイオパニングを行い、モデルタンパク質であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)に対して特異

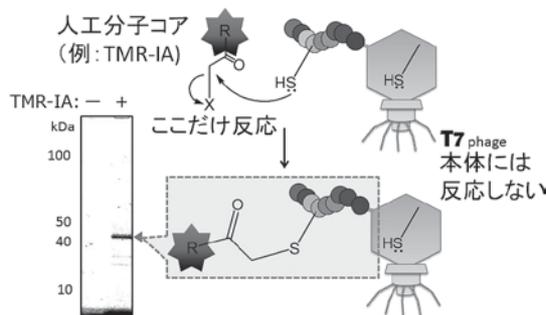


図1. ファージタンパク質(Gp10)上に提示させたペプチド内SH基への人工分子コアのワンポット導入(Gp10 based-thioetherification; 10BASE<sub>d</sub>-T)。インセットは10BASE<sub>d</sub>-T後のファージタンパク質すべてをゲル電気泳動(SDS-PAGE)/蛍光イメージングしたもの。

注) ファージディスプレイ法にもっぱら使われるM13ファージとは異なり、T7ファージは頭部と尾部を構成するタンパク質の外側にSH基が露出していない。そのため、たとえば蛍光性コア(ローダミン;TMR)を用いて10BASE<sub>d</sub>-Tを行った後に、ファージを丸ごと電気泳動(SDS-PAGE)すると、さまざまなファージタンパク質のうちペプチド融合Gp10タンパク質のバンドのみが光り、それ以外のタンパク質は光らない(図1; インセット)。このように学部教科書にてお馴染みのS<sub>N</sub>2反応にて、混ぜるだけで酵素反応のように提示ペプチド特異的にコアを導入できる。なおGp10タンパク質内のSH基には反応せず、提示ペプチドのみにコアを導入できたことは、本蛍光バンドをトリプシン処理した後にLC-MS/MS解析することで同定している<sup>1)</sup>。

\* 著者紹介 <sup>1</sup>電気通信大学大学院情報理工学専攻(准教授) E-mail: taki@pc.uec.ac.jp  
<sup>2</sup>鹿児島大学大学院理工学専攻生命化学専攻

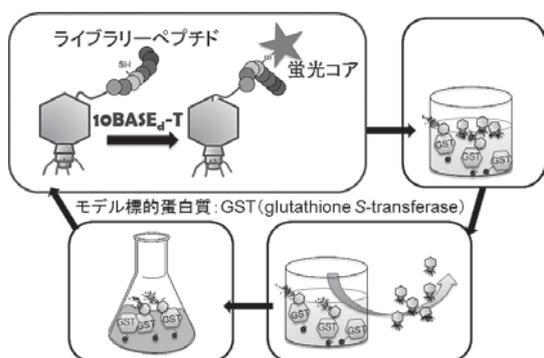


図2. 標的タンパク質に対するバイオパンニング

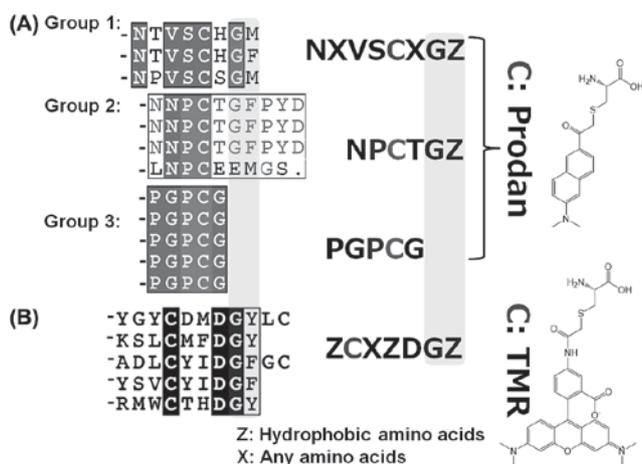


図3. GST結合性を持つprodan進化体, またはTMR進化体の共通アミノ酸配列

的に結合する分子群 (ポリクローン) を濃縮した (図2).

この中から無作為に16クローンを選び出し, GST結合活性をELISA法によって評価したところ, 15クローンがファージ上ペプチドとprodanコアとが共有結合した際のみGST結合能を持つことが確認された. これらprodan進化体クローンのペプチド部分の配列は3種類に分類できた (図3A). 比較として, ソルバトクロミック性を持たない蛍光色素 (ロードミン; TMR) をコアとして周辺構造を分子進化させた結果も併せて図3Bに示す. 得られた分子構造は, prodan進化体と同様にC末端配列のGZ (Zは疎水性アミノ酸) が一致しているものの, コア周辺およびN末端側のペプチド配列は異なるものと収束していた. このように異なる人工コアを同じ標的に対して独立に進化させることで, 生物進化では試行されなかった未知の構造モチーフ (配列空間) を別々に探索可能なことも示唆された.

次に, 図3Aに示した3種類の進化体の代表配列をそれぞれ化学合成し, Prodanコアと結合させた後GST結

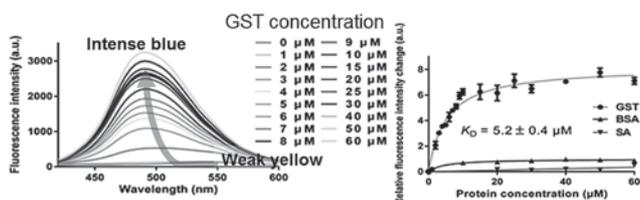


図4. GST結合性を持つprodan進化体 (NTVSCHG) のタンパク質添加に伴う蛍光色および強度の変化 (励起波長: 365 nm). 負対照実験の例として, GSTの代わりにウシ血清アルブミン (BSA) およびストレプトアビジン (SA) を添加した時の551 nmにおける蛍光強度の変化も併せて示す.

合に伴う蛍光特性の変化を調べた. 当初の予想通り, すべての進化体において蛍光色の変化および蛍光強度の増大が観測された. この中で一番性能の良かった進化体 (グループ1) の蛍光滴定結果を図4に示す. GSTに対しては解離定数 ( $K_D$ ) 5.2  $\mu$ Mの特異的な結合が見られた一方で, 標的以外のタンパク質 (カゼインなど計9種類) を加えた際には結合せず, 蛍光挙動に殆ど変化がなかった. なお, グループ1-3いずれの進化体においてもグルタチオン存在下での競合実験よりGSTのグルタチオン結合ポケット内に結合していることが示唆された.

同進化体のGSTへのリン酸緩衝溶液中での結合状態を, 構造有機化学的に基礎解析して理論計算結果との比較考察を行うことは, 学術的にも興味深い. 今回は, ①等温滴定型熱量測定 (isothermal titration calorimetry; ITC) による結合定数などの算出, ②飽和移動差核磁気共鳴 (STD-NMR) 分光測定や二次元NMR測定によるエピトープマッピング, ③ワークステーションを用いた分子動力学 (MD) 計算などにより総合的にこれを行った.

ITCの結果, prodanコアと周辺ペプチド構造の両方がGSTに対する特異的な結合に必要であることが分かり, 疎水性相互作用および分子間力 (おそらく水素結合) の両方が有為に働いていることが示唆された (図5A). STD-NMRにて, GSTから進化体への分子間核オーバーハウザー効果 (NOE) を半定量的に計測してエピトープマッピングを行った結果, 疎水性相互作用が可能な残基のうち, prodanコアとバリン (V) がGSTの基質結合ポケットにもっとも近接しており, 特に分子認識に重要であることが分かった (図5B).

一方で, GSTと進化体とのドッキングモデルをAutoDock Venaを用いて作製した. 次に, もっともエネルギーが低いモデルを基点として溶媒である水分子や塩類の影響も加味して, GSTを含む全原子の室温における分子運動を分子動力学 (MD) 計算にてシミュレーションした. 図5Cに示したようにprodanコアは基質結合ポ

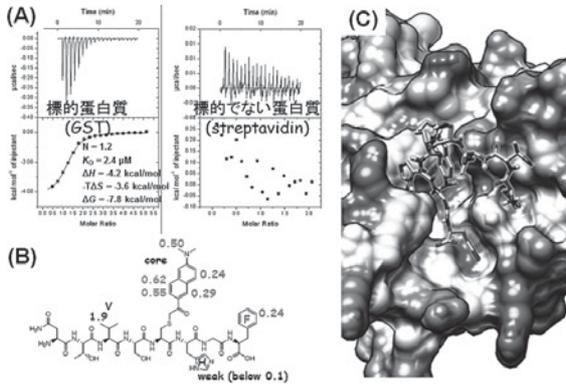


図5. Prodan進化体(NTVSCGHF)のGST結合性の評価。(A) ITCによる熱力学パラメータの算出, (B) STD-NMRによるエピトープマッピング, (C) 分子動力学計算によるGSTとのドッキングモデル作製。

ケットの奥深くに位置されており、溶媒から完全に遮蔽されていることが示唆された。コア以外の残基も含め、MD計算により決定した本構造は、上記の蛍光滴定、ITC、NMRの実験結果と良い一致を見た。

現在、抗体並の結合親和性を持つセンサー分子の作製を目指して鋭意検討を行っている。近い将来、血液や尿中の特定タンパク質の存在量を、高価な機器を用いずに蛍光色および強度の変化により瞬時に測定する系を創出し、医療現場における迅速診断に応用したいと考えている。

### 実施例2：超分子コアの分子進化<sup>3,4)</sup>

がん関連タンパク質Hsp90は、さまざまながん細胞の成長に必要なタンパク質のフォールディング(巻き戻り)を補助する分子シャペロンであり、近年がん治療の標的として注目を浴びている。Hsp90阻害剤として、Hsp90-N末端ドメイン(Hsp90-NTD)内のATP結合ポケットに結合する環状低分子(ゲルダナマイシンおよびその誘導体)が知られているが、毒性が高すぎて臨床研究が頓挫しており、それに代わる阻害剤の開発が求められている。

ゲルダナマイシンはエーテル酸素3個を含む水素結合受容性原子を有しており、(+の電荷を沢山持つ)塩基性タンパク質であるHsp90との静電的な相互作用による親和性が高い。これを模倣して、人工コアにオリゴエチレングリコール基を持たせ、全体として環状構造を持つクラウンエーテル類縁体のライブラリーを作製し、この中からHsp90特異的に結合する超分子を探索した(図6A, B)。完全長Hsp90に対する6ラウンドのバイオパニングの結果、ただ一つの進化体を得られた(図6C)。

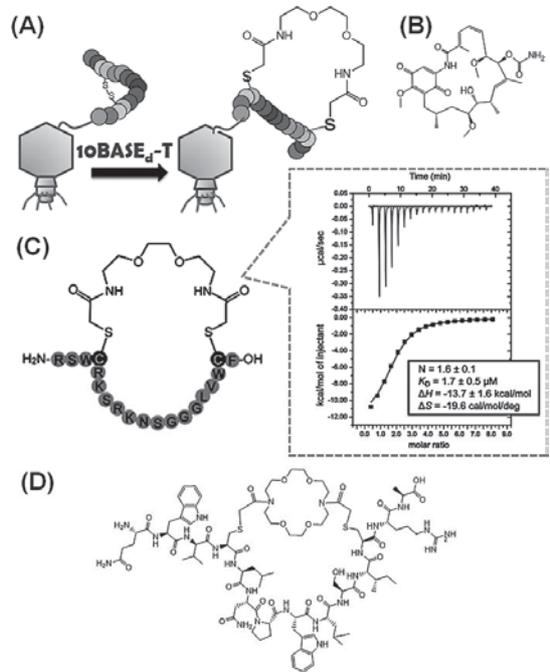


図6. (A) 10BASE<sub>d</sub>-T法によるクラウンエーテル類縁体ライブラリーの作製, (B) Hsp90-NTD結合性を持つ天然物ゲルダナマイシンの構造, (C) バイオパニングにより得られたHsp90-NTD結合体の構造およびITCによる熱力学パラメータの算出, (D) Hsp90-NTD結合性クリプタンドの構造。

GSTプルダウン実験を行った結果、本進化体はHsp90のN末端ドメインのみに特異的に結合し、それ以外のドメインには結合しないことが分かった。また当初の狙い通り、人工コア内の水素結合受容性エーテル酸素が、同供与体であるHsp90との結合にエンタルピー的に効果的に働いたことがITCの結果より示唆された。オリゴエチレングリコールコアを欠損させた周辺ペプチド構造だけではHsp90-NTDに結合しないことから、人工コアが分子認識に重要であると結論づけた。

本クラウン類縁体の弱点は、こうした分子間力がHsp90への結合に対して有利に働いているにも関わらず、結合力が弱いことである( $K_D = 1.7 \mu\text{M}$ )。分子全体の自由度を適度に抑制することが問題解決に有効と考え、人工コアにアザクラウンエーテル誘導体を持たせたライブラリーを10BASE<sub>d</sub>-T法にて作製し直し、これを用いて同様のバイオパニングを行うことで、Hsp90-NTD結合性クリプタンド(図6D)へと進化させた。ITCの結果、Hsp90への結合に伴うエントロピー損失を最小限に抑えたまま、エンタルピー変化がクラウン型(図6C)と比べてさらに有利に働いた結果、本クリプタンドは抗体並みに強く特異的に標的に結合することが分かった( $K_D = 60 \text{ nM}$ )。

クリプタンドやクラウン類縁体のような環状超分子化合物を、金属抽出などの従来用途ではなく生体分子と特異的に相互作用させたのは本研究が初めてである。これら超分子はいずれも、Hsp90-NTDのATP結合ポケット以外のサイトに結合することが分かっており、従来とは異なる機構にてHsp90を阻害する新型の抗がん剤となりうる可能性があるため、今後、細胞生物学的にこれを検証する。

### 結 語

以上、人工分子コアをファージ上で分子進化させることで、標的・特異的に結合するネオバイオ分子の取得を行った。従来型の修飾ペプチドあるいは架橋ペプチドを作るという発想ではなく、人工コアの存在を際立たせつつ、これと周辺ペプチドとを共進化させることで標的・特

異性などを補うというスタンスにて、医療応用可能な有用分子を創生し、疾患の治療/診断などに役立てたい。

### 謝 辞

日々の弛まぬ努力および根気強い試行錯誤にて、実験検討の積み重ねを行った福永博士（現北陸先端大）・ラボの学生達、および南先生（学芸大）、Yang先生（Wisconsin大）、渡辺先生（電通大）をはじめとするさまざまな協同研究者の方々に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Fukunaga, K. *et al.*: *Mol. BioSyst.*, **9**, 1314 (2013).
- 2) Taki, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **88**, 1096 (2016).
- 3) Fukunaga, K. *et al.*: *Chem. Commun.*, **50**, 3921 (2014); inside cover article.
- 4) 瀧 真清：特願2015-243334.