

cDNA ディスプレイによる機能性ペプチドアプタマーの創生

根本 直人

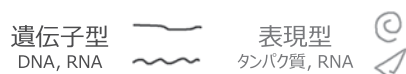
はじめに

機能性ペプチドを開発するうえで日本は国際的にみてもその鍵となる優れた基盤技術を有する。一つはペプチド学会を中心とするペプチド科学に関する長い伝統に支えられた化学的アプローチの蓄積。さらに最近では分子生物学的、生物工学的アプローチによる機能性ペプチドの創出技術があげられる。後者の基盤技術としてPURE systemに代表される無細胞翻訳系技術¹⁾、また多様な機能を付与する非天然アミノ酸導入技術²⁾、さらにこれらの多様なペプチドライブラリから機能性ペプチドのスクリーニングを可能にする遺伝子型-表現型対応付け技術などがある。特に筆者らはライブラリの拡張性と淘汰系の自由度の大きさがペプチドの「機能性」に直結することから、さまざまな条件下でも膨大なライブラリからの淘汰を可能にする遺伝子型-表現型対応付け技術に注力してきた。

遺伝子型-表現型対応付け

分子進化を人工的に試験管内で生じさせるためには、1) 開放系、2) 突然変異系、3) 遺伝子型と表現型の対応付けがなされている分子系の3条件が必要である³⁾。1) の開放系は物質系がエントロピー増大の法則に反して秩

序化するための物理化学的要請(プリゴジン)であり、2) は遺伝情報の進化に不可欠なライブラリの多様性創出に関係する。3) は生命の機能性分子であるタンパク質の情報が異なる分子であるDNAが担っていることによる。そのためタンパク質(機能)の進化のためには遺伝子型と表現型の対応付けが必要となる。遺伝子型と表現型の対応付けには、a) リボザイム型、b) ウイルス型、c) 細胞型、さらにチップ上へのアレイ化により対応付けを行う、d) 外部知性型に分類できる(図1)。ここで注意すべきことはこの分類では実際の「ウイルス」や「細胞」を意味していないことである。ここでいう「ウイルス型」は遺伝子型(DNAまたはRNA)と表現型(タンパク質)が単純に結合した「形態」を意味しており、たとえばファージディスプレイに代表されるようにゲノムにそれがコードしているタンパク質(コートプロテイン)が単純に結合しているものをいう。また、「細胞型」とは遺伝子型と表現型が一つの「袋」に入った形態を有するものと定義できる。この観点で分類すると抗体医薬開発で利用される酵母ディスプレイは酵母表層に提示するタンパク質が細胞というゲノムを包んだ容器に連結していると考えられる。このため細胞を利用しているものの進化工学的にはファージディスプレイと同じ「ウイルス型」対応付けに分類できる。それではペプチドやタンパク質を進化させるうえでどちらが有利であろうか?これはどのような機能を選択するかに依存する。一般にウイルスは細胞と比べて増殖という単一機能が優れていることが知られている。したがって単一のペプチドやタンパク質機能の進化はウイルス型が細胞型に比べて有利である。一方、細胞型は複数の遺伝子が関与するシステムの進化を考える場合に有利であり、合成生物学やシステムバイオロジーとの相性が良い。筆者は主に単一分子の機能進化に興味をもっていたためウイルス型の対応付けを研究してきており、次に紹介する無細胞翻訳系を用いたcDNAディスプレイ法によるウイルス型の試験管内進化系を確立した。



方法	対応付け
同一分子 	リボザイム型
結合する 	ウイルス型
袋に入れる 	細胞型
チップ上に固定 	外部知性型

図1. 遺伝子型(情報)と表現型(機能)の対応付け

mRNA ディスプレイ法 (In vitro virus法)

生命に限らず自然は単純なものから複雑なものへと進化する。進化工学自体もこの例にもれず、1990年にもつ

とも単純な対応付けであるEllingtonらによるリボザイム型の試験管内淘汰実験⁴⁾に続き、ほぼ時期を同じくしてSmithらの繊維状バクテリオファージfdを用いたウイルス型対応付け試験管内淘汰法である“ファージディスプレイ”法が登場した⁵⁾。ファージディスプレイ法は大腸菌を用いて従来の分子生物学的手法の延長上で操作できるきわめて汎用的かつ有力な進化工学的手法である。しかし、一方でファージディスプレイは大腸菌を用いるためにディスプレイできるペプチドやタンパク質に細胞毒性がある場合はウイルス表面に提示できず、探査できる配列が制限される。また、その多様性も原理的に大腸菌の個数(1 mlあたり10⁶程度)に制限されるなどの課題もあった。無細胞翻訳系を用いた、いわゆる*in vitro*ディスプレイ技術は上述の課題を解決できるだけでなく非天然アミノ酸の導入や試験管内で合成できる簡便性などの利点がある。リボソーム上ではmRNA(遺伝子型)とそれにコードされたタンパク質(表現型)は連結されている。そこで無細胞翻訳系中でこの状態を維持したままスクリーニングにもっていく方法が、リボソームディスプレイである⁶⁾。通常、リボソームはポリゾームを形成して一つのmRNA上に複数結合しているため、最初のリボソームをmRNAの3'末端でポーズさせることができれば安定な形態と予想される。そこでリボソームディスプレイでは終始コドンを取り除き、さらにリボソームの動きをポーズさせるための構造形成配列をmRNAの3'末端にもたせる。リボソームディスプレイは扱いが比較的簡単ではあるものリボソームが室温で動くため、4°Cという低温室で操作しなくてはならない。また、共有結合で遺伝子形(mRNA)と表現型(タンパク質)が結合していないため選択条件に制限がある。この課題を克服するため筆者らは抗生物質のピューロマイシンがリボソームに取り込まれ伸長中ポリペプチド鎖に連結することを利用して、mRNAの3'末端にDNA(このDNAはリボソームの動きを止めるため)を介してピューロマイシンを付加することを試みた。この結果、わずか

ばかりの効率ではあるが、無細胞翻訳系中でmRNAとそれにコードされたタンパク質がピューロマイシンを介して連結することを発見した⁷⁾。無細胞翻訳系が入った試験管(*in vitro*)を宿主とするウイルス型分子ということで*in vitro virus*(インヴィトロウイルス)と当初名付けたが、リボソームディスプレイもこの意味では*in vitro virus*となり紛らわしい。ウイルス型対応付け分子はファージディスプレイ以来、タンパク質を提示する実体で表すことが多いため、mRNAディスプレイがわかりやすい。しかしながら、mRNAディスプレイは調製段階できわめて効率が悪いステップがある。その問題点を列挙すると、1) mRNAとピューロマイシン・リンカーの連結効率、2) mRNAとタンパク質の連結効率、3) mRNA-タンパク質連結体(mRNAディスプレイ分子)の翻訳系からの精製効率がある。さらにmRNAとタンパク質がRNAで連結されているため選択条件に制約がある。次に紹介するcDNAディスプレイ法は、単にmRNAをcDNAに変換して安定化しただけではなく、上記の各プロセスの課題を克服するためのさまざまな工夫がリンカーに加えられており、mRNAディスプレイに比べ各段に効率がよく、扱いやすく高機能性分子の取得に便利なツールとなっている。

cDNAディスプレイ法

cDNAディスプレイ法⁸⁾はまずmRNAディスプレイを作製した上で、cDNA化するためにmRNAディスプレイ法として扱われることも多い。しかしながら、独自のリンカーの工夫により提示されるタンパク質はcDNAと共有結合しているため、mRNAディスプレイに比べ選択(淘汰)段階でさまざまな拡張性が期待できる。しかも、その調製はmRNAディスプレイに比べ、はるかに簡単で迅速である(表1)。従来のmRNAディスプレイでのmRNAとピューロマイシン・リンカーの連結効率は低く、たとえば、mRNA:リンカー=1:200の混合比でT4 RNAリガーゼを用いて15~40 h反応させて

表1. ピューロマイシン・リンカーの効率比較

ピューロマイシン・リンカーの種類	cnvK Linker (2015) ¹⁰⁾	SBP Linker (2011) ⁹⁾	cDNA display (2009) ⁸⁾	mRNA display (2009) ¹⁷⁾ (<i>In vitro virus</i>) (2003) ¹⁸⁾
mRNAとの連結反応時間	1 (min)	10 (min)	60 (min)	900-2400 (min) (15~40 h)
mRNA:リンカー	1:1~1.5	1:1~1.5	1:4	1:200
最終収率	>95%	>95%	>90%	80~90%
リガーゼ反応後の精製	不要	不要	必要	必要

も連結効率は80~90%である。しかも高価なピューロマイシン・リンカーの99%は無駄になり、コスト的にも厳しい。これは利用するT4 RNAリガーゼが一本鎖核酸同士を連結する酵素であることによる。cDNAディスプレイでは同じT4 RNAリガーゼを用いるものの、この効率を高めるためにリンカーとmRNAのハイブリダイゼーションを利用している。これによりmRNA：リンカーの混合比は1：1程度でよくピューロマイシン・リンカーを無駄にしない。しかも、反応時間は10分程度で連結効率を90%程度に上げることに成功した⁹⁾。さらに重要なことは余分なピューロマイシン・リンカーが残らないため、フリーのピューロマイシンを取り除くための精製が不要であることである。そのため、cDNAディスプレイではT4 RNAリガーゼによるmRNAとピューロマイシン・リンカーの連結反応液をそのまま無細胞翻訳系に投入することが可能になった。これはナノテクノロジーのようなオンチップでのプロセスにcDNAディスプレイを応用するうえではきわめて有用である。最近、北陸先端科学技術大学院大学の藤本らが開発した光架橋剤cnvKを利用して、酵素を使わずにmRNAとピューロマイシン・リンカーを紫外線(UV = 360 nm)照射するだけで連結が可能になった(図2)¹⁰⁾。この場合、照射時間は数10秒から数分であり、蒸留水中で反応させるためヌクレアーゼが活性化しない。そのため、T4 RNAリガーゼなどの酵素を用いた場合に比べて飛躍的にmRNAの分解が抑制されることもわかった。cDNA

ディスプレイのもう一つの特徴は逆転写用プライマーがピューロマイシン・リンカーに「内臓」されていることである。このため逆転写のために改めて後から逆転写用プライマーを投入する必要がない。一方、逆転写のためにはポリゾーム状態になってmRNAに結合しているリボソームをmRNAから離さなくてはならない。このためcDNAディスプレイではmRNA-リボソーム-タンパク質の複合体のままピューロマイシン・リンカーのビオチンを介してアビジン磁性体ビーズ表面に固定化される。これにより無細胞翻訳系からmRNA-リボソーム-タンパク質複合体が迅速に取り出され、EDTAを加えるとリボソームが解離してmRNA-タンパク質複合体(mRNAディスプレイ)となる。あとは磁性体ビーズ上で逆転写反応を行えば5分程度でcDNAディスプレイとなる。この逆転写反応により合成されたタンパク質とそのcDNA部分がピューロマイシン・リンカーを介して共有結合で結びついており、mRNAディスプレイに比べて生理的条件下で安定な結合体となる。cDNAディスプレイの強みはこの安定化された形態で磁性体ビーズ上に固定化されていることである。磁性体ビーズはバッファー交換が容易であるためタンパク質発現後の翻訳後修飾が短時間で可能になる。試験管内の反応になるため生体由来の酵素的な翻訳後修飾だけでなく一般的な化学修飾も可能であり従来の分子多様性をより拡張できる。これは新規の生体分子(ネオバイオ分子)の創生に関する重要な手法となる。

多様な機能性ペプチド

cDNAディスプレイ法が安定化したことにより、今までのmRNAディスプレイでは難しい選択系が可能になった。たとえば、cell-penetrating peptidesの取得^{11,12)}やG protein-coupled receptors (GPCRs)に結合するペ

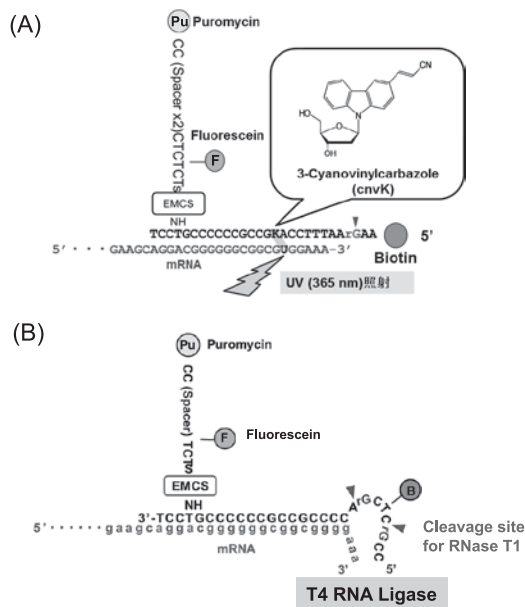


図2. ピューロマイシン・リンカー。(A) cnvKリンカー、(B) short biotin-segment puromycin (SBP)-リンカー。

CP1: FAM-GGGSMGCGPSNFDDQPRNYTFNSIDSGYCSGQNH

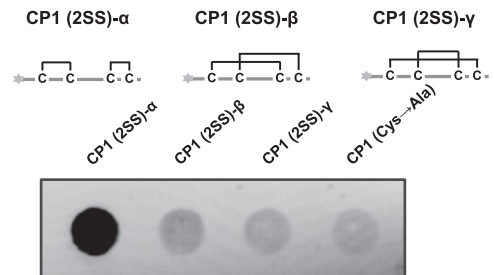


図3. アミノ基結合ペプチド。アミノ基修飾されたガラス基板上に結合するCP1ペプチド。CP1(2SS)-αの架橋構造の場合のみ結合する。上段はCP1の配列。下線はシステイン残基。

プチドアプタマーの取得¹³⁾では生細胞を標的としたスクリーニングが必要になる。従来、生細胞はリボヌクレアーゼなどがあるためファージディスプレイが用いられていたが、mRNAディスプレイでの例はなかった。Cell-penetrating peptidesの取得ではペプチドが細胞内に取り込まれる必要があり、ファージでは大きすぎる問題点があった。cDNAディスプレイはもっとも単純なペプチドとDNAの連結体であり、細胞内にも取り込まれると考えられる。

cDNAディスプレイの特徴の一つは翻訳後修飾がしやすいことである。ファージディスプレイでは複数のジスルフィド結合をランダムにもつペプチドライブラリは大腸菌のペリプラズムを通過できないために提示できない。筆者らは二つ以上のジスルフィド結合を含むペプチドライブラリをcDNAディスプレイに提示してタンパク質以外の標的として低分子化合物を分子認識できるかを検討した。その結果、驚くべきことに30残基程度のペプチドに二つのジスルフィド結合を眼鏡型に形成させることで固相上のアミノ基を分子識別可能であることがわかった(図3)¹⁴⁾。これは架橋ペプチドによる分子認識能の拡張を示す良い例と思われる。

最近筆者らは、このcDNAディスプレイを用いて4種類の原始アミノ酸(グリシン; G, アラニン; A, アスパラギン酸; D, バリン; V)からなる30残基のランダムなペプチドライブラリからtRNAに結合するものがあるかどうかを調べた。その結果、上記のようなアミノ酸残基からなるペプチドは静電的にRNAに結合しないにもかかわらずtRNAの3'末端CCA-3'に特異的に結合するペプチドが選択されてきた。これは生命の起源的にも興味深い結果である¹⁵⁾。

ネオバイオとしての機能ペプチド

100残基のタンパク質でもその組合せの数は 10^{130} であり、この数は宇宙の全原子数 10^{80} より大きい。このような膨大な配列空間は、地球上の生命が誕生以来、地球環境という条件下でほんの一部しか試されていないことになる。未探査の配列区間にはどのような機能(宝)が隠されているか。近年の次世代シーケンサーを含む進化分子工学およびその周辺技術の急激な発展は、生物による進化だけでなく、人工的進化を加速させ未踏の配列空間の迅速な探査を可能にする。特に、タンパク質やペプ

チドは水系の溶媒中での振る舞いしか対象としてこなかったが、cDNAディスプレイは有機溶媒中でも扱うことが可能である。また、同じアプタマーでもペプチド以外に核酸もある。ペプチドと核酸は標的タンパク質への相互作用の様式が異なることから複合化することで更なる機能の高度化も可能と思われる¹⁶⁾。このように従来ない機能を複合的に作り上げることで従来の生体分子では不可能であった新しい機能性生体分子(ネオバイオ)を実現するうえで、cDNAディスプレイによる機能性ペプチドが貢献できればと考えている。

2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞した大村智先生は土壌生物から有用な天然有機化合物の探索をされたが、これからは実験室の試験管の中からも有用な化合物が続々と発見される日がくるのではないかと期待している。

謝 辞

大学院生のころからご指導をいただいている総合研究大学院大学伏見譲教授、共同研究でご指導をいただいている北陸先端科学技術大学院大学藤本健造教授、産総研研究員望月佑樹博士、その他、紙面の都合で記載できませんが共同研究でお世話になった方々に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Shimizu, Y. *et al.*: *FEBS J.*, **273**, 4133 (2006).
- 2) Terasaka, N. *et al.*: *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 6513 (2015).
- 3) 伏見 譲編: 進化分子工学, NTS (2013).
- 4) Ellington, A. D. *et al.*: *Nature*, **346**, 818 (1990).
- 5) Scott, J. K. *et al.*: *Science*, **249**, 386 (1990).
- 6) Hanes, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937 (1997).
- 7) Nemoto, N. *et al.*: *FEBS Lett.*, **414**, 405 (1997).
- 8) Yamaguchi, J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, e108 (2009).
- 9) Mochizuki, Y. *et al.*: *ACS Comb. Sci.*, **13**, 478 (2011).
- 10) Mochizuki, Y. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **212**, 174 (2015).
- 11) Kamide, K. *et al.*: *Int. J. Mol. Med.*, **25**, 41 (2010).
- 12) Kono, E. *et al.*: *Nat. Comm.*, **3**, 951 (2012).
- 13) Ueno, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 11121 (2012).
- 14) Mochizuki, Y. *et al.*: *Chem. Commun.*, **50**, 5608 (2014).
- 15) Kumachi, S. *et al.*: *ACS Omega*, **1**, 52 (2016).
- 16) Dupont, D. M. *et al.*: *Bioconjug. Chem.*, **27**, 918 (2016).
- 17) Tabata, N. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **37**, e64 (2009).
- 18) Miyamoto-Sato, E. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **31**, e78 (2003).