機能性ペプチド探索に向けた
スクリーニング方法の提案

Study on construction of a screening method to develop functional peptides

久米 暁子

KUME Akiko

名古屋大学大学院 工学研究科 化学・生物工学専攻

Department of Biotechnology, School of Engineering,

Nagoya University, Japan

Contents

第 1 章 1

1.1 タンパク質結合性ペプチドとその利用 1

1.2 有用ペプチド探索のためのペプチドライブラリー 2

1.3 ペプチドの物理化学的特徴と統計解析 3

1.4 本論文の目的と構成 4

1.5 参考文献 8

第 2 章 14

2.1 はじめに 14

2.2 実験方法 15

2.2.1 ペプチドアレイの作製 15

2.2.2 アミノ酸の物理化学的性質を利用した分類手法に基づくランダムペプチドライブラリーの作製 16

2.2.3 ペプチドアレイを用いた目的タンパク質に高結合性を示すペプチドの探索 17

2.2.4 目的タンパク質に対する高結合性ペプチドのルールの解析 17

2.3 実験結果及び考察 18

2.3.1 物理化学的性質によるアミノ酸の分類とペプチドライブラリーの構築 ... 18

2.3.2 分類したアミノ酸による機能性ペプチドの解析 19

2.3.3 IL-2、及び IgG 高結合性ペプチドの探索 20

2.3.4　結合ペプチドの要素比較 22
2.3.5　物理化学的分類に基づいたペプチドの結合性解析 23
2.4　結言 43
2.5　参考文献 44
第 3 章 46
3.1 はじめに 46
3.2 実験方法 49
3.2.1 ペプチドアレイの作製 49
3.2.2 ペプチドライブラリーの構築 49
3.2.3 ペプチドアレイを用いた結合アッセイ 50
3.2.4 主成分分析 51
3.2.5 IL-2 及び IgG における高結合性ルールと低結合性ルールの抽出 51
3.3 実験結果 52
3.3.1 各標的タンパク質の主成分分析における変数の決定 52
3.3.2 4 残基ペプチドライブラリーにおける主成分分析を用いた高結合性及び低結合性ルールの決定 53
3.3.3 IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ペプチドの解析 54
3.3.4 新規 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ペプチドの解析 55

3.4 考察 56

3.5. 結言 90

3.6. 参考文献 91

第 4 章 96

研究業績 99

謝辞 101

第 1 章

序論

1.1　タンパク質結合性ペプチドとその利用

ペプチドとは、数残基から十数残基のアミノ酸がペプチド結合で連結した分子であり、我々の体内で起こる複雑な生体反応を制御している。ほとんどのペプチドはタンパク質がその分解酵素によって分解・切断されることで作られ、ペプチドの生理活性はその受容体に結合することで誘導される。過去数十年に渡って、ホルモン様ペプチドに代表される膨大な種類の生理活性ペプチドが報告されてきた[1-11]。これらのペプチドは生体適合性が良く、副作用が発生しにくいため、医薬品や化粧品、機能性食品といった幅広い分野で有用な分子として用いられている[12-14]。

近年では、ペプチドの高い標的結合性や親和性、物理化学的安定性を利用することで、精製用の分子タグや分子リガンド、標的タンパク質の検出用プローブとしても注目されている[15-20]。例えば、His タグ（$(His)_{6-10}$）[16]や FLAG タグ（DYKDDDDK）[17]は、タンパク質の精製回収用の分子タグとして幅広く用いられている。また、分子プローブとして生体イメージングや疾患の診断への利用も多く報告されている[21-24]。更に、組織工学分野では、様々な基底膜成分由来のペプチドが発見され、ペプチドがその受容体に結合し、選択的に作用することで、細胞の組織培養に利用されている。例えば、ラミニン B2 由来の RNIAEIIKDI による神経突起伸長や、BMP-2 由

来の NSPVNSKIPKACCVPTELSAI による骨誘導などがある[25]。最近では、血管内皮細胞には接着するが平滑筋細胞には接着しにくいなど、結合性に特異性のある機能性ペプチドの開発も行われている[26]。このように、標的分子に結合能を持つペプチドの開発が広く行われている。

1.2　有用ペプチド探索のためのペプチドライブラリー

ペプチドは 20 種のアミノ酸が連なった分子であるため、その配列の組み合わせは膨大である。例えば、抗体結合ペプチドは 13-16 残基[27]、I 型 MHC 結合ペプチドは 9-10 残基[28]といったように、一般的に、長鎖のペプチドほど標的分子に対する結合能は高くなるが、配列の組み合わせは膨大になっていく。そのため、有用ペプチドを効率的に探索・開発するためには、ペプチドライブラリーを効率的・戦略的に構築する必要がある。

ペプチドライブラリーを構築する手法としては、ファージディスプレイ法[29]や、コンビナトリアルースプリット合成法[30]、ビーズディスプレイ法[31]等が、最も強力で一般的なツールとして知られている。これらの手法は、**Table 1-1** のような特徴があり、10^5－10^9 という大きなライブラリーから、最も高い結合能を持つペプチドを選出するのに適している。しかし、これらの手法は全てポジティブスクリーニングに基づいた探索法であるため[32-35]、選択されなかったペプチドの結合性に関する情報が一切得られないという課題がある。

また、アミノ酸を 1 残基ずつ固相合成するペプチドアレイ法もライブラリーを構築する手法として利用されている。本手法は、SPOT 固相合成技術でセルロース膜上に 9-fluorenylmethoxycarbonyl（Fmoc）基を修飾したアミノ酸を 1 残基ずつ合成するものである[1]。利点としては、ペプチドの残基数や配列置換などの設計や合成が容易である点、非天然分子が導入できる点、効果のなかった配列・効果を減少させた配列を含む全てのペプチドの結合能を評価できる点が挙げられ、目的タンパク質への結合に重

要なペプチド中の残基の検出に適している[36-38]。これまでに、本手法を用いて Bcl-3 模倣ペプチドや、E3 ユビキチンリガーゼ結合ペプチドが探索されている[36, 39]。しかし、ライブラリーサイズは上記手法にやや劣り、長鎖ペプチド等の組み合わせが膨大なペプチドに対しては適さないという課題があった。

更に、ペプチドライブラリーの素となるアミノ酸配列にも課題がある。標的分子に対する天然のリガンド配列を元にライブラリーを作製する場合[4-6, 25, 26, 39]、リガンド配列には含まれないペプチドは探索対象から外れてしまうため、ペプチドライブラリーにおけるアミノ酸の組み合わせの網羅性が課題である。従って、標的分子への結合性が定量的に評価でき、簡便で戦略的、かつ漏れのないペプチドライブラリーの構築手法が求められている。

1.3　ペプチドの物理化学的特徴と統計解析

タンパク質間の相互作用には、側鎖のアミノ酸の持つ物理化学的性質が駆動力になっている。例えば、HIV-1 の C-C ケモカイン受容体（CCR5）に含まれる second extracellular loop 部分と細胞表面のグリコプロテイン gp120 との結合には、3 つの芳香族アミノ酸残基を介した疎水性相互作用が関与することや、グルカゴン用ペプチドとその受容体（GLP1）の結合には、アルギニン残基を介した静電相互作用が関与するが知られている[40, 41]。このように、タンパク質間や、タンパク質－ペプチドの結合において、側鎖の持つ物理化学的性質は重要な働きを持っている。しかし、こうした結合に関与する物理化学的性質は親水性や電荷など無数のパラメーターが知られている上に[42-46]、タンパク質やペプチドの側鎖が取り得る構造は膨大な組み合わせがある。更に、有用ペプチドの探索においては、上記のように漏れのないライブラリーが求められているため、相互作用の組み合わせが更に膨大になり、その解析は容易ではない。

一般的には、情報解析の手法を取り入れ、大量の情報を扱う研究が生化学分野、製

薬分野などにおいて進められており、標的分子への結合性の解析がなされている。計算科学的なアプローチとしては、コンピューターシミュレーションによるドッキングモデルなどが提案され、標的分子への結合性の向上や、結合部位の推定に応用されている[47-49]。本手法の利点としては、評価したい分子が無くても結合性を予測できる点であり、稀少な分子や非天然分子の解析も可能である。また、古典的な統計解析を用いて実測値を解釈するアプローチとして、多変量解析がある。近年では、未学習データにも拡張可能なカーネル法、人工ニューラルネットワーク、サポートベクターマシンといった解析手法を用いて、物理化学的性質を変数としてタンパク質－ペプチドの結合性を評価、解釈する手法も報告されている[50-53]。

多変量解析の中でも、主成分分析は情報の欠落なく次元を圧縮する演算手法であり、次元の圧縮は「主成分（principal components：PCs）」という合成変数に全説明変数を反映させることで行われる。本手法は、古くから統計的な解析で利用される一般的な手法であり、遺伝子発現解析やメタボローム解析等の生物学的研究にも使われている[54, 55]。しかし、主成分分析を用いてタンパク質－ペプチドの結合性評価を行った例は報告されていない。

そこで私は、タンパク質間の相互作用の駆動力であるアミノ酸側鎖の物理化学的性質を変数として、主成分分析を用いて次元を圧縮し、相互作用に重要な物理化学的変数を抽出することで、戦略的なペプチドライブラリー構築に繋がるのではないかと考えた。

1.4　本論文の目的と構成

以上の背景から、本論文では固相合成法により作製したペプチドアレイと、アミノ酸の物理化学的性質を変数とした主成分分析を用いて、以下のような候補ペプチドライブラリー構築と、標的タンパク質に対するペプチドの結合性を定量的に評価可能なモデル構築を行うことで、簡便・戦略的な新規の機能性ペプチド探索への応用を目的

とした。その中で、1）スクリーニングアレイとしてどういうデザインで何種類のペプチドライブラリーを用意すればよいか、2）またその際、結合性に関与する物理化学的性質を、網羅性を保ちつついかに選択するべきか、3）長鎖ペプチドのスクリーニングにおけるライブラリーサイズをいかに縮小するかという課題の解決を目指した。

以下に本論文の構成と、各章の具体的な内容を述べる。

第 1 章では、本研究の背景と研究目的を述べた。

第 2 章では、SPOT 固相合成法で作製したペプチドアレイを用いて、標的分子に対して高結合性を示す機能性ペプチドをより簡便で戦略的に探索できるスクリーニングアレイの構築を目的とした。そのために、20 種類のアミノ酸をその物理化学的性質から 4 つの group に分類し、これを網羅する 256 種のペプチド（$4^4 = 256$）を含んだ 4 残基ペプチドライブラリーを作製した。この物理化学的性質による分類の有用性を検証するために、モデル標的分子として用いた線維芽細胞、胆汁酸、ZnO 微粒子、インターロイキン 2（IL-2）、免疫グロブリン G（IgG）において、上記 4 つの group に対するモデル標的分子の結合性の傾向を評価した。更に、IL-2 と IgG についてペプチドアレイによる結合評価の利点である、高結合・低結合ペプチドを共に評価した。その結果、各タンパク質に対して特徴的な物理化学的性質のルールが得られ、かつ、各標的分子へ高・低結合ペプチドにおいても特徴的な物理化学的性質のルールが得られることがわかったことから、本ペプチドライブラリーはスクリーニングアレイとして使える最小サイズになる可能性が示唆された。

ここまでに 256 種のペプチドライブラリーによって、4 残基ペプチドの標的分子に対する結合性評価が可能であることが分かったが、より結合性が高まる長鎖ペプチドへ応用する際には、ライブラリーサイズが更に拡大することが考えられる（例：6 残基では 4096 種、8 残基では 65536 種）。そこで第 3 章では、標的分子における長鎖ペプチドの結合性の特徴を、短鎖ペプチドの結合性から明らかにするモデルの構築を目

的とした。そのために、2 章で用いた 256 種類×2 セットのである 512 ペプチドから成る 4 残基ペプチドライブラリーの主成分分析を実施し、ペプチドの物理化学的特徴を表す変数を 2 つの主成分に圧縮した。第 2 章と同様に IL-2 と IgG をモデル標的分子とし、これらの標的に対するペプチドの結合親和性を、上記 512 ペプチドの含むペプチドアレイを用いて評価した。この結合親和性を主成分プロットに展開すると、IL-2 と IgG の双方において高結合性ペプチドと低結合性ペプチドのプロットが局在化しており、ペプチドの結合性が分類できることが判明した。次に、この 4 残基ペプチドの主成分分析から得られた結合性の傾向から、更に長鎖である 8 残基ペプチドの結合性の傾向を予測できるか検証した。その結果、IL-2 と IgG の双方において、8 残基の高結合性ペプチドは、4 残基の高結合性ペプチドの主成分プロット周辺に濃縮されることが判明した。これにより、4 残基ペプチドのライブラリーの主成分分析結果を用いて、8 残基ペプチドを高結合性群と低結合性群に区別でき、長鎖ペプチド（8 残基）の探索に拡張適用できることがわかった。これは、わずか 512 ペプチドで 8 残基の機能性ペプチドの性質を調べることに成功しており、候補ペプチドの探索ライブラリーサイズを、20 種のアミノ酸を網羅的に使用した場合（$20^8=2.56\times10^{10}$ ペプチド）より、大幅に縮小できた。

第 4 章では、本研究を総括し、今後の期待を述べた。

Table 1-1　ペプチドライブラリー構築手法の特徴

手法名	原理	利点	課題
ファージ ディスプレイ法	バクテリオファージに任意の遺伝子を組み込み、その表面にペプチドを発現させ、標的との結合性を評価する。	ライブラリーサイズが大きい(10^5－10^9)	・提示ペプチドの配列はランダムであり、アミノ酸の残基数や配列置換などの配列設計が困難 ・非天然分子の導入は不可 ・操作が煩雑 ・低結合ペプチドは取得不可 ・取得ペプチドの配列調査が必須
コンビナトリアル－スプリット合成法	組み合わせ論に基づき、複数種のアミノ酸溶液を混合均一化させた後に等分し、次の複数種のアミノ酸をランダムに結合させる。	・ライブラリーサイズが大きい(10^5－10^9) ・非天然分子の導入が容易	・ペプチドの配列はランダムであり、アミノ酸の残基数や配列置換などの配列設計が困難 ・低結合ペプチドは取得不可 ・取得ペプチドの配列調査が必須
ビーズディスプレイ法	ビーズ単体上にアミノ酸を 1 残基ずつ合成する。	・ライブラリーサイズが大きい(10^5－10^9) ・非天然分子の導入が容易	・ペプチドの配列はランダムであり、アミノ酸の残基数や配列置換などの配列設計が困難 ・低結合ペプチドは取得不可 ・取得ペプチドの配列調査が必須
ペプチドアレイ法	SPOT 固相合成技術でセルロース膜上にアミノ酸を 1 残基ずつアレイ状に合成する。	・アミノ酸の残基数や配列置換などの配列設計が容易 ・非天然分子の導入が容易 ・合成が容易 ・全てのペプチドの結合能を評価可能	ライブラリーサイズが小さい(10^2－10^4)

1.5 参考文献

1. T. S. Danowski, K. Hofmann, H. Yajima and C. Moses, ACTH-like activity in man of a synthetic 23 amino acid polypeptide, Metabolism, 10, 835-847, 1961.
2. N. Basso and N. A. Terragno, History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertension, 38, 1246-1249, 2001.
3. R. A. Turner, J. G. Pierce and V. V. du, The purification and the amino acid content of vasopressin preparations. J. Biol. Chem., 191, 21-28, 1951.
4. C. H. Li and D. Chung, Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 73, 1145-1148, 1976
5. J. Hughes, T. W. Smith, H.W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan and H. R. Morris, Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity, Nature, 258, 577-580, 1975.
6. M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, Nature, 402, 656-660, 1999.
7. R. L. Batterham, M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone and S. R. Bloom, Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake, Nature, 418, 650-654, 2002.
8. E. S. Hanson and M. F. Dallman, Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, J. Neuroendocrinol., 7, 273-279, 1995.
9. K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida, Protein and polymer analysis up to m/z 100000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151-153, 1988.
10. G. P. Smith, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, 228, 1315-1317, 1985.

11. R. B. Merrifield, Solid-phase peptide synthesis, Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol., 32, 221-296, 1969.
12. J. H. Hamman, G. M. Enslin and A. F. Kotze, Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments, Bio Drugs 19,165-177, 2005.
13. A. K. Sato, M. Viswanathan, R. B. Kent and C. R. Wood, Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development, Curr. Opin. Biotechnol., 17, 638-642, 2006.
14. K. J. Rutherfurd-Markwick and P. J. Moughan, Bioactive peptides derived from food. J. AOAC. Int., 88, 955-966, 2005.
15. K. Terpe, Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, Appl. Microbiol. Biotechnol., 60, 523-533, 2003.
16. R. Waibel1, R. Alberto1, J. Willuda, R. Finnern, R. Schibli, A. Stichelberger, A. Egli, U. Abram, J. P. Mach, A. Plückthun, and P. A. Schubiger, Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex, Nat. biotechnol., 17, 897 -901, 1999.
17. T. P. Hopp, K. S. Pricket, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March, D. P. Ceretti, D. L. Urdal and P. J. Conlon, A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. Nat. Biotechnol., 6, 1204–1210, 1988.
18. A. Murray, M. Sekowski, D. I. R. Spencer, G. Denton and M. R. Price, Purification of monoclonal antibodies by epitope and mimotope affinity chromatography, J. Chromatogr. A, 782**,** 49–54, 1997.
19. A. Murray, A, D. I. R. Spencer, S. Missailidis, G. Denton and M. R.Price, Design of ligands for the purification of anti-MUC1 antibodies by peptide epitope affinity chromatography. J. Peptide Res., 52, 375–383, 1998.
20. A. C. A. Roque, C. R. Lowe and M. A. Taipa, Antibodies and genetically engineered

related molecules: production and purification, Biotechnol. Prog., 20, 639-654, 2004.

21. X. Chen, P. S. Conti and R. A. Moats, *In vivo* Near-Infrared Fluorescence Imaging of Integrin αvβ3 in Brain Tumor Xenografts, Cancer Res., 64, 8009-8014, 2004.
22. Y. Qiao, H. Tang, G. R. Munske, P. Dutta, C. F. Ivory and W. J. Dong, Enhanced fluorescence anisotropy assay for human cardiac troponin I and T detection, J. Fluoresc., 21, 2101-2110, 2011.
23. K. E. Sapsford, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, and I. L. Medintz, Detection of HIV-1 specific monoclonal antibodies using enhancement of dye-labeled antigenic peptides, Bioconjugate Chem., 21, 393-398, 2010.
24. X. H. Wang, C. Y. Wang, K. G. Qu, Y. J. Song, J. S. Ren, D. Miyoshi, N. Sugimoto and X. G. Qu, Ultrasensitive and selective detection of a prognostic indicator in early-stage cancer using graphene oxide and carbon nanotubes, Adv. Funct. Mater., 20, 3967-3971, 2010.
25. Peter X. Ma, Biomimetic materials for tissue engineering. Adv. Drug Deliv. Rev., 60, 184-198, 2008.
26. Kanie K., Kato R., Zhao Y., Narita Y., Okochi M., Honda H., Amino acid sequence preferences to control cell-specific organization of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts, J. Pept. Sci., 17(6):479-486 (2011).
27. Hatanaka, T., Ohzono, S., Park, M., Sakamoto, K., Tsukamoto, S., Sugita, R., Ishitobi, H., Mori, T., Ito, O., Sorajo, K., Sugimura, K., Ham, S., and Ito, Y.: Human IgA-binding peptides selected form random peptide libraries: affinity maturation and application in IgA purification, J. Biol. Chem., 287, 43126–43136 (2012).
28. Wang, F. Y., Guo, J. Q., and Zhang, G. P.: Analysis of the linear epitope for Fc-binding on the mouse IgG Fc receptor (moFcγR1) by synthetic peptide, Genet. Mol. Res., 13, 4647–4653 (2014).

29. Smith, G. P.: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, 228, 1315–1317 (1985).
30. Lam, K. S., Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M., and Knapp, R. J.: A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, Nature, 354, 82–84 (1991).
31. Lebl, M., Krchnak, V., Sepetov, N. F., Seligmann, B., Strop, P., Felder, S., and Lam, K. S.: One-bead-one-structure combinatorial libraries, Biopolymers, 37, 177-198 (1995).
32. Fassina, G., Ruvo, M., Palombo, G., Verdoliva, A., and Marino, M.: Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies, J. Biochem. Biophys. Methods, 49, 481–490 2001
33. Fassina, G., Verdoliva, A., Odierna, M. R., Ruvo, M., and Cassini, G.: Protein a mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies, J. Mol. Recognit., 9, 564–569 (1996).
34. Sandin, C., Linse, S., Areschoug, T., Woof, J. M., Reinholdt, J., and Lindahl, G.: Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide, J. Immunol., 169, 1357–1364 (2002).
35. Palombo, G., Verdoliva, A., and Fassina, G.: Affinity purification of immunoglobulin M using a novel synthetic ligand, J. Chromatogr. B, 715, 137–145 (1998).
36. Waibel, R., Alberto, R., Willuda, J., Finnern, R., Schibli, R., Stichelberger, A., Egli, A., Abram, U., Mach, J. P., Plückthun, A., and Schubiger, P. A.: Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex, Nat. biotechnol., 17, 897–901 (1999).
37. Hopp, T. P., Pricket, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Ceretti, D. P., Urdal, D. L., and Conlon, P. J.: A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification, Nat. Biotechnol., 6, 1204–1210 (1988).

38. Murray, A., Sekowski, M., Spencer, D. I. R., Denton, G., and Price, M. R.: Purification of monoclonal antibodies by epitope and mimotope affinity chromatography, J. Chromatogr. A, 782, 49–54 (1997).
39. Klecker M, and Dissmeyer N, Peptide Arrays for Binding Studies of E3 Ubiquitin Ligases. Methods Mol Biol., 145, 85-94, 2016.
40. Abayev M., Moseri A., Tchaicheeyan O., Kessler N., Arshava B., Naider F., Scherf T., Anglister J., An extended CCR5 ECL2 peptide forms a helix that binds HIV-1 gp120 through non-specific hydrophobic interactions, FEBS J., 282(10):1906-1921 (2015).
41. Wootten D., Reynolds C. A., Koole C., Smith K. J., Mobarec J. C., Simms J., Quon T., Coudrat T., Furness S. G., Miller L. J., Christopoulos A., Sexton P. M, A Hydrogen-Bonded Polar Network in the Core of the Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Is a Fulcrum for Biased Agonism: Lessons from Class B Crystal Structures, Mol. Pharmacol., 89(3):335-347 (2016).
42. Zimmerman. J. M., Eliezer, N., and Simha, R.: The characterization of amino acid sequences in protein by statistical methods, J. Theoret. Biol., 21, 170–201 (1968).
43. Kyte, J., and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol., 157, 105–132 (1982).
44. Takano, K., and Yutani, K.: A new scale for side-chain contribution to protein stability based on the empirical stability analysis of mutant proteins, Protein Eng., 14, 525–528 (2001).
45. Zamyatin, A. A.: Protein volume in solution, Prog. Biophys. Mol. Biol., 24, 107-123 (1972).
46. David, L. N., and Michael, M. C.,: Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., p. 118, Worth Pub, UK (2000).
47. Sato T., Honma T., Yokoyama S., Combining Machine Learning and

Pharmacophore-based Interaction Fingerprint for in silico Screening., Journal of Chemical Information and Modeling, 50, 170-185 (2010).

48. Almudallal A. M., Saika-Voivod I., Stewart J. M., Folding and binding energy of a calmodulin-binding cell antiproliferative peptide, J. Mol. Graph. Model, 61:281-289 (2015).
49. Harish B. M., Saraswathi R., Vinod D., Devaraju K. S., Discovery of a latent calcineurin inhibitory peptide from its autoinhibitory domain by docking, dynamic simulation, and in vitro methods, J. Biomol. Struct. Dyn., 34(5):983-992 (2016).
50. Brusic, V., Rudy, G., Honeyman, G., Hammer, J., and Harrison, L.: Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network, Bioinformatics, 14, 121–130 (1998).
51. Tung, C. W., and Ho, S. Y.: POPI: Predicting immunogenicity of MHC class I binding peptides by mining informative physicochemical properties, Bioinformatics, 23, 942–949 (2007).
52. Salomon, J., and Flower, D. R.: Predicting class II MHC-peptide binding: a kernel based approach using similarity scores, BMC Bioinformatics, 7, 501 (2006).
53. Zhang, G. L., Bozic, I., Kwoh, C. K., August, J. T., and Brusic, V.: Prediction of supertype-specific HLA class I binding peptides using support vector machines, J. Immunol. Methods, 320, 143–154 (2007).
54. M. D. Smith, Antibody production in plants, Biotechnol. Adv., 14,267-281 (1996).
55. Qi, W., Fan, Z. C., Wang, C. L., Hou, L. H., Liu, J. F., Cao, X. H.: Non-targeted metabolomic reveals the effect of salt stress on global metabolite of halotolerant yeast Candida versatilis and principal component analysis, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 41, 1553-1562 (2014).

第 2 章

物理化学的特性を利用した
機能性ペプチドの戦略的探索手法の構築

2.1　はじめに

近年、固相合成法を用いたペプチドアレイが、目的材料や分子とペプチドの相互作用を評価できる強力なツールとして注目されている。ペプチドとの結合実験は、SPOT 技術でセルロース膜上に合成したペプチドアレイを用いて行われている[1]。本手法は技術的に簡便で応用性が高く、ペプチドの配列設計や合成が行いやすいため、目的タンパク質への結合に重要なペプチド中の残基の検出や、目的タンパク質に対する高結合性ペプチドの探索に適している[2-4]。これらの理由から、当研究室では固相合成されたペプチドアレイを用いて、アンジオテンシン高結合性ペプチド[5]や、アポトーシス誘導ペプチド[6, 7]、α－アミラーゼ高結合性ペプチド[8]といった、様々な機能性ペプチドを探索してきた。更に、本手法は目的分子に対するペプチドごとの結合性データから、統計解析の手法を用いた結合性の解析も行えるという特徴がある。こうした解析は、ファージディスプレイ法のように、標的に高結合なペプチドしか得られず、他の候補ペプチドの定量的な結合性データが得られない探索法では不可能である。そこで、当研究室では結合性データからペプチドのアミノ酸配列とその機能の

関係性を明らかにする計算手法を開発することに成功し、線維芽細胞接着ペプチド[9]や胆汁酸高結合性ペプチド[10]の物理化学的性質のルールを抽出できた。細胞接着ペプチドにおいては、「1 残基目と 4 残基目に小サイズのアミノ酸、2 残基目に高等電点のアミノ酸」というルールを得ている。胆汁酸高結合性ペプチドにおいては、「Trp、Tyr、Phe、Leu、Ile、Val が豊富」という構造学的なルールを得ている。このように、物理化学的性質によるペプチドの結合性の解析は、機能性ペプチドの探索において多大な利点を持っている。

一方で、膨大な候補分子から機能性ペプチドを見つけるためには、合理的なペプチド探索手法が求められる。ペプチドアレイにおいても、より多種のペプチドを合成すれば、機能的な候補ペプチドが見つかる可能性は高くなるだろう。しかし、多種のペプチドを固相合成する際に、多大な時間を必要とする。このため、より合理的なペプチドの探索のためには、ペプチドアレイに合成する候補ペプチド数を必要最小限にすることが重要であり、そのために候補ペプチドライブラリーの設計を熟慮の上で決定する必要があった。

一般的に、目的タンパク質とペプチド間の相互作用は、ペプチドの持つ物理化学的な性質が駆動力である。そこで本章ではまず、20 種類のアミノ酸を疎水度や電荷といった物理化学的な性質から 4 群（4 group）に分類した。次に、その 4 group を網羅するように 256 種類のペプチドを合成し、これらのペプチドのインターロイキン 2（IL-2）や免疫グロブリン G（IgG）に対する結合性を調査した。

2.2 実験方法

2.2.1 ペプチドアレイの作製

ペプチドアレイは、参考文献[10]と同様に合成した。まず、セルロース膜（grade 542; Whatman, Maidstone, UK）を β－アラニンと Fmoc-11-aminoundecanoic acid を用いて活性化させた。次に、N, N'-dimethyl formamide 中に縮合剤 N, N’-diisopropyl carbodiimide

（濃度 0.2 M）、1-hydroxybenzotriazole（濃度 0.25 M）、9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acid（濃度 0.25 M）を混和し、アミノ酸を活性化させた溶液を、ペプチド自動スポッター（ASP222, IntavisAG, Köln, Germany）を用いて滴下した。滴下を終えたセルロース膜は N, N'-dimethyl formamide で洗浄後、20%のピペリジンで脱保護し、更に N, N'-dimethyl formamide、メタノールで順に未反応の 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acid を洗浄した。これらの滴下から洗浄の操作を 1 残基ごとに繰り返すことで、ペプチドを伸長させた。全残基を合成した後、側鎖の脱保護剤 m-cresol : thioanisol : ethandithiol : trifluoroacetic acid (1 : 6 : 3 : 40)中で 2 時間振盪した。その後、ジエチルエーテル、メタノール、phosphate-buffered saline（PBS、pH 7.4）で順に m-cresol : thioanisol : ethandithiol : trifluoroacetic acid (1 : 6 : 3 : 40)の溶液を洗浄した

2.2.2　アミノ酸の物理化学的性質を利用した分類手法に基づくランダムペプチドライブラリーの作製

まず、高結合性ペプチドを効率的で戦略的に探索するために、20種類のアミノ酸をその物理化学的性質から4つのgroupに分類した。疎水度や等電点といったアミノ酸の物理化学的性質は、アミノ酸のデータベース（ChemFinder）から取得した。等電点においては、全アミノ酸の等電点の平均で各アミノ酸の等電点を標準化することで、正電荷と負電荷を分けた。次に、これらの物理化学的性質に基づいて、20種類のアミノ酸を非電荷高疎水性のgroup 1（I、L、V、F、C、M、A、G）、非電荷低疎水性のgroup 2（Y、T、S、W、P、Q、N）、正電荷性のgroup 3（H、R、K）、負電荷性のgroup 4（E、D）という4つのgroupに分類した（**Fig. 2-1**）。更に、その4 groupを網羅するように256種類のペプチドを合成した。この256種類のペプチドを1つのライブラリーとして、2つのライブラリー（ver. 1及びver. 2）を作製した。**Table 2-1**に示すように、2つのライブラリーは、同じ物理化学的性質を示すが、アミノ酸配列が異なるペプチドで構成されている。

2.2.3　ペプチドアレイを用いた目的タンパク質に高結合性を示すペプチドの探索

目的タンパク質である IL-2 に対する結合実験は、**Fig. 2-2** のように行った。上記方法で合成したペプチドアレイを PBS（pH 7.0）に数回洗浄し、ペプチドアレイの作製に用いた有機系溶媒を PBS に置換した。次いで、1%の Block Ace Powder（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を含む PBS 溶液中で 1 時間浸漬し、標的タンパク質の非特異吸着を抑制した。0.05%の Tween-20（T-PBS）を含む PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、そのペプチドアレイを 130 nM の IL-2 を含む PBS 溶液に入れ、小型回転撹拌機（NR-3, Taitec Corporation, Saitama, Japan）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の IL-2 は 0.01%の T-PBS での 5 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。続いて、IL-2 に対する一次抗体（ab9618, Abcam, Cambridge, UK）と 0.25%の Block Ace Powder を含む PBS 溶液にペプチドアレイを入れ、小型回転撹拌機（NR-3）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の一次抗体は 0.01%の T-PBS での 5 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。更に、Alexa 48 が修飾された二次抗体（ab150117, Abcam）と 0.25%の Block Ace Powder を含む PBS 溶液にペプチドアレイを入れ、小型回転撹拌機（NR-3）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の一次抗体は 0.01%の T-PBS での 10 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。

各ペプチドスポットの 494/519 nm の蛍光強度は、Typhoon FLA-9500（GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK）を用いて測定し、ImageQuantTL（GE Healthcare Life Sciences）を用いて定量化した。

2.2.4　目的タンパク質に対する高結合性ペプチドのルールの解析

各ペプチドへの目的タンパク質の結合量は、各ペプチドスポットの蛍光強度から

次式を用いて算出した。

（ペプチドスポットの蛍光強度）＝（目的タンパク質添加時のペプチドスポットの蛍光強度）－（目的タンパク質非添加時のペプチドスポットの蛍光強度）

ここから、低結合性ペプチドと高結合性ペプチドを判別する閾値を設け、高結合ペプチドの数を評価した。閾値は、平均蛍光強度とその標準偏差の合計値である。

高結合性ルールの決定においては、まず各目的タンパク質に対して結合性の高い上位 10%のペプチド（1 つのタンパク質あたり 50 ペプチド）を選出した。続いて、ver. 1 と ver. 2 のライブラリーに含まれる全 512 ペプチドを、同じ group を 3 つ持つペプチドごとに分類して、64 個のクラスに分けた。各クラスには最大で 2^3 と等しい 8 つのペプチドが含まれる。そのクラスに対して、結合性上位 50 ペプチドがいくつランクインするかを評価し、クラスに含まれる最大数 8 に占めるランクインしたペプチドの割合（ratio）を算出し、ratio が 0.5 以上だったクラスを高結合ルールとした。

（ratio）＝（クラス中の高結合ペプチドの数）/（クラス中の全ペプチドの数：8 ペプチド)

2.3　実験結果及び考察

2.3.1　物理化学的性質によるアミノ酸の分類とペプチドライブラリーの構築

タンパク質同士やタンパク質とペプチドの相互作用は、その表面の物理化学的性質が駆動力となっている。まず、特に相互作用において重要な物理化学的特徴を抽出するために、タンパク質同士の相互作用に重要な疎水性と等電点といった物理化学的性質に基づいて 20 種類のアミノ酸を分類した。各アミノ酸の疎水度と等電点を **Fig.2-1A** に示す。2.2.2 に記載したように、等電点はその平均値で標準化している。**Fig.2-1A** から、20 種類のアミノ酸を非電荷高疎水性の group 1（I、L、V、F、C、M、A、G）、非電荷低疎水性の group 2（Y、T、S、W、P、Q、N）、正電荷性の group 3（H、R、K）、負電荷性の group 4（E、D）という 4 つの group に分類した（**Fig.2-1B**）。

2.3.2　分類したアミノ酸による機能性ペプチドの解析

当研究室では、ランダムに作製したペプチドライブラリーを用いて、今までにいくつかの機能性ペプチドを探索してきた。例えば、643 種類の 5 残基ペプチドのライブラリーから細胞接着ペプチドを探索した[9]。同様に、2212 種の 6 残基ペプチドのライブラリーからは類胆汁酸高結合性ペプチドを、420 種類の 6 残基ペプチドのライブラリーからは ZnO 高結合性ペプチドは、それぞれ探索した[10, 11]。本研究ではまず、これらのペプチドを探索した際の結合データを、アミノ酸の物理学的性質による分類手法に当てはめ、その結合性を解析した。

その結果を **Table 2-2、2-3、2-4** に示す。これらの Table は、各標的分子に高結合性を示したペプチドのアミノ酸構成を、ライブラリー全体のアミノ酸構成と比較したものである。細胞接着ペプチドにおいては、結合性上位 30 個のペプチドには group 3 のアミノ酸が 1、2、5 残基目に ratio 基準でそれぞれ 0.40、0.37、0.40、group 1 のアミノ酸が 4 残基目に 0.47 含まれていた（**Table 2-2**）。胆汁酸高結合性ペプチドにおいては、結合性上位 40 個のペプチドには group 2 のアミノ酸が 1、2、3 残基目に ratio 基準でそれぞれ 0.53、0.53、0.65 含まれていた（**Table 2-3**）。ZnO 高結合性ペプチドにおいては、結合性上位 30 個のペプチドには group 3 のアミノ酸が 1 残基目に ratio 基準で 0.37、group 1 のアミノ酸が 2、3、4 残基目にそれぞれ 0.57、0.57、0.47 含まれていた（**Table 2-4**）。

細胞接着ペプチドに関しては、側鎖の小さいアミノ酸（Trp、Tyr、Phe、Arg、Lys、His 以外）が 1、4 残基目に、等電点の高いアミノ酸（Arg、Lys）が 2 残基目にあることが好ましいと、以前に報告している[9]。本研究の group 3 には正電荷の、group 1 にはいくつかの側鎖の小さいアミノ酸が含まれているため、本章で発見した「2 残基目に group 3、4 残基目に group 1」があると細胞接着ペプチドにおいて好ましいという傾向は、以前実施した結果と一致している。

続いて、胆汁酸高結合性ペプチドに関しては、van der Waals 体積の大きいアミノ酸（Trp、Tyr、Arg、Phe）が 3 残基目に、安定性への寄与が大きい側鎖を持つアミノ酸（Trp、Phe、Ile、Tyr、Leu、Val、Pro）が 2、4 残基目にあることが好ましいと、以前に報告している[10]。本研究の group 2 には Trp、Tyr、Pro が含まれており、本章で発見した「2、3 残基目に group 2」があると胆汁酸高結合性ペプチドにおいて好ましいという傾向は、以前実施した結果と一致するものである。

また、ZnO 高結合性ペプチドに関しては、van der Waals 体積の大きいアミノ酸が 1 残基目にあることが好ましいと、以前に報告している[11]。本研究の group 3 は正電荷の Arg、Lys、His で構成されているが、これらはまた、van der Waals 体積の大きいアミノ酸でもある。本研究における 1 残基目には group 1 と 3 が共に 0.37 と大きな割合で含まれていた点と、group 1 にも van der Waals 体積の大きいアミノ酸である Phe と Met が含まれていることから、本章で発見した「1 残基目に group 3」があると ZnO 高結合性ペプチドにおいて好ましいという傾向は、以前実施した結果と大きく異なってはいない。

このように、以前に探索したペプチドの結合データを、アミノ酸の物理学的性質による分類手法に当てはめて解析した結果から、高結合性ペプチドにおける標的分子に特異的な物理化学的特徴を得ることができた。その中には、以前の結合の傾向と一致する特徴がいくつか得られた。従って、アミノ酸を物理化学的特徴で分類することで、簡便で戦略的なペプチドライブラリーを構築でき、機能性ペプチドの探索に応用できたと言える。

2.3.3　IL-2、及び IgG 高結合性ペプチドの探索

次に、本章では標的分子として IL-2 に着目し、4 残基のペプチドライブラリーから IL-2 高結合性ペプチドを探索した。探索手法にはサンドウィッチ ELISA 法を用い、IL-2 に対する一次抗体、及び蛍光標識した二次抗体を用いて、IL-2 に対するペプチド

の結合性を評価した（**Fig. 2-2**）。各ペプチドスポットの蛍光シグナルは、標的分子である IL-2 を添加した場合と添加しない場合の蛍光強度の差から求めた。また、IL-2 を添加しない場合のシグナル強度とは、IgG である抗 IL-2 抗体に対するペプチドの親和性を表している。従って、本章では IL-2 高結合性ペプチドと同時に、IgG 高結合性ペプチドも探索した。

まず、高結合性ペプチドが有する配列ルールを探索するための戦略的なペプチドライブラリーを設計した。このライブラリーには、4 group の物理化学的性質を網羅する 256 種のペプチドで構成されている。また、単一ライブラリーに結果が偏ることが無いように、4 つの group のアミノ酸が同じ頻度で出現するように設計した 2 つのライブラリー（ver. 1 と ver. 2、計 512 種のペプチド）を用意した。ライブラリーの中では、ペプチドは 1111 から 4444 の順に並んでいる（**Fig. 2-1C**）。まず、これらのライブラリーを用いて標的分子に対する結合実験を 2 回ずつ行ったところ、2 回の実験における各ペプチドスポットの結合シグナルは相関係数が非常に高かったことから（標的分子あり：R^2＝0.898、標的分子なし：R^2＝0.899）、2 回の結合実験における平均値を結合シグナルとして採用することにした。具体的には、結合シグナルは下記の式に則って算出した。

（ペプチドスポットの蛍光強度）＝（標的分子添加時のペプチドスポットの蛍光強度）－（標的分子非添加時のペプチドスポットの蛍光強度）

「標的分子非添加時のペプチドスポットの蛍光強度」とは、IgG に対するペプチドの結合性を表している。

上記のペプチドライブラリーを用いて行った IL-2 に対する結合実験の結果を **Fig. 2-3** に示す。512 スポットの平均蛍光強度は 1.23×10^6 a.u.であり、ver. 1、ver. 2 共に、同様の IL-2 への結合性が見られた。その中で、全体の上位約 10%に相当する 50 ペプチドに着目し、IL-2 高結合性ルールの抽出に用いた。また、これらのペプチドは、512 スポットの「平均＋SD」（ver. 1 で 2.8×10^6、ver. 2 で 2.7×10^6）より高い蛍光強度値

を示したことから、この 50 ペプチドを IL-2 に対する高結合性ペプチドとした（**Table 2-5A**）。

続いて、IgG に対する結合実験の結果を **Fig. 2-4** に示す。512 スポットの平均蛍光強度は 5.6×10^6 a.u.であり、そこから算出した閾値（平均＋SD）を元に 82 の高結合性ペプチドを得た。更に、この中から全体の約上位 10%に相当する 50 ペプチドに着目し、IgG 高結合性ルールの抽出に用いることとした（**Table 2-5B**）。

2.3.4　結合ペプチドの要素比較

各標的分子に対する結合性を比較するために、上記で得られた各 50 ペプチドに含まれる group の割合を解析した。その結果、IL-2 高結合性ペプチドには group 3 のアミノ酸がどの残基においてもほとんど含まれない一方で、group 1 のアミノ酸が 2、4 残基目に多く含まれることが判明した（**Table 2-6**）。IgG においては、全体的に group 2 と 3 のアミノ酸が多く含まれる傾向にあった。

ここから、私は IL-2 と IgG では高結合性ペプチドとなる物理化学的性質が異なるという仮説を立てた。その違いは、おそらく分子表面の等電点によって生じるのだと考えられる。生物情報データベースである ExPASy を用いて各分子表面の等電点を算出したところ、IL-2 では 7.7 であったことから、結合実験に用いた緩衝液中（ヒトの血液と同じ pH である 7.4）では IL-2 は正に帯電している。一方で、IgG の等電点はおよそ 5〜7 であるため[12]、同緩衝液中では負に帯電しているはずである。従って、IL-2 は正電荷をもつ group 3 のアミノ酸を避けた一方で、IgG は結合したのだと考えられる。

また、以前のランダムペプチドライブラリーには group 1 と 2 のアミノ酸が頻繁に表れる傾向があったが（**Table 2-2、2-3、2-4**）、今回のペプチドライブラリーには 1111 から 4444 まで同じ頻度で含まれている。このように、本手法では各アミノ酸の出現頻度が揃っているので、物理化学的性質による高結合性ペプチドの偏りのない解

析ができる。

2.3.5　物理化学的分類に基づいたペプチドの結合性解析

物理化学的性質による 4 group の分類に基づいて高結合性ペプチドのルールを抽出できることを確かめるべく、本章では 4 group と蛍光強度との関連に注目した。各 group の組み合わせごとにペプチドをクラス分けし、各クラスの平均蛍光強度をまとめた表を **Table 2-7** に示す。表中の「Single」はある group を配列中に少なくとも一つ含むペプチド、「Double」はある group の組み合わせを配列中に少なくとも一組含むペプチドを表している。欄内の数字は、ペプチドの平均蛍光強度を表している。

その結果、IL-2 の結合実験においては、ペプチドに group 1 または group 4 が含まれる場合に IL-2 が多く結合する傾向があった（**Table 2-7A**）。全ペプチドの平均蛍光強度が 1.23×10^6 a.u.であったのに対し、group 1 または group 4 をいずれかの位置に含むペプチドの平均蛍光強度はそれぞれ 1.38×10^6 a.u.と 1.81×10^6 a.u.であった。2 つの group の組み合わせ解析したところ、group 1 と 4、group 2 と 4、group 4 と 4 を同時に含むペプチドで蛍光強度が増加していた。各平均蛍光強度は、それぞれ 2.05×10^6、1.90×10^6、2.50×10^6 a.u.であった。その中でも、group 4 を同時に 2 ヶ所含む場合では、全ペプチドの平均蛍光強度の 2 倍以上の蛍光強度が得られた。一方で、group 3 が含まれるペプチドでは IL-2 の結合量が大きく減少した。

IgG の結合実験においては、蛍光強度に大きな差が見られなかった（**Table 2-7B**）。蛍光強度は group 2 と 3、及び group 3 と 3 の組み合わせにおいて高く、それぞれ 7.19×10^6 a.u.及び 7.06×10^6 a.u.であった。全平均の蛍光強度である 5.6×10^6 a.u.と比較すると、それぞれ 27%と 24%の増加であった。

上記のように、高結合性ペプチドの物理化学的特徴は、各標的分子で大きく異なっていた。この違いを明確に表すために、結合性上位 50 ペプチドの内、両標的に特徴的な性質を比較した（**Table 2-5**）。IL-2 に高結合な group 1 と 4、group 2 と 4、group

4 と 4 を持つペプチドは、全 512 ペプチド中の 62%（319 ペプチド）存在するが、IL-2 の上位 50 ペプチドでは 81%（42 ペプチド）を占めていた。group 4 を 2 ヶ所持つペプチドに関しては、全 512 ペプチド中の 26%（134 ペプチド）存在するが、IL-2 の上位 50 ペプチドでは 20%（40 ペプチド）まで増加していた。従って、IL-2 に高結合なペプチドには、group 1 と 4、group 2 と 4、group 4 と 4 を持つペプチドが濃縮されていると言える。

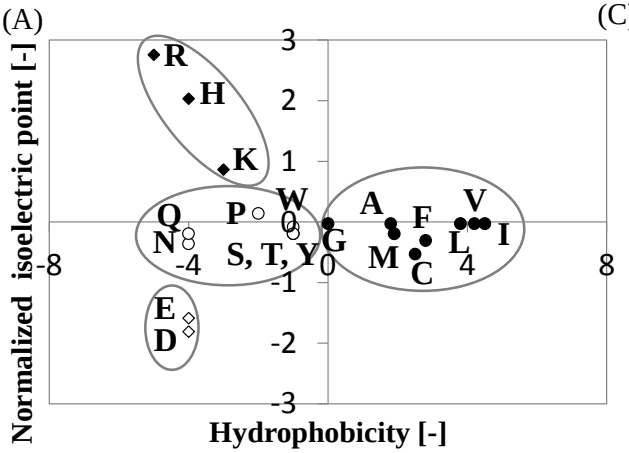
IgG に関しては、高結合な group 2 と 3、group 3 と 3 を持つペプチドは、全 512 ペプチド中の 56%（286 ペプチド）存在するが、上位 50 ペプチドでは 81%（41 ペプチド）を占めている。group 2 と 3 を持つペプチドに関しては、全 512 ペプチド中の 43%（220 ペプチド）存在するが、上位 50 ペプチドでは 72%（36 ペプチド）まで増加していた。従って、IL-2 に高結合なペプチドには、group 2 と 3、group 3 と 3 を持つペプチドが濃縮されていると言える。

更に、重要な物理化学的性質が何残基目に含まれるかを加味した解析を行った。上位 50 ペプチドにおいて、**Table 2-7** で選ばれた高結合ルールが含まれる位置ごとにペプチドの数を数え、**Table 2-8** にまとめた。IL-2 においては group 1 と 4、group 2 と 4、group 4 と 4 を持つペプチド（**Table 2-8A**）、IgG においては group 2 と 3、group 3 と 3 を持つペプチドにそれぞれ注目した（**Table 2-8B**）。この解析方法では 4 残基中の 2 ヶ所は固定されていないため、図中の各欄内には最大 32 通りのペプチド（4 Groups × 4 Groups × 2 ver.）が含まれるため、本章ではこの 32 通りおける結合性上位 50 ペプチドの出現頻度を調べた。その結果、同じ group を含んでいても、含まれる位置によって結合性に偏りが見られた。例えば、IL-2 高結合ルールにおける group 1 と 4 を含むペプチドに関しては、2 残基目か 4 残基目が group 1 で 1 残基目か 3 残基目が group 4 のペプチドが高頻度で選ばれ、特に 2 残基目が group 1 で 1 残基目が group 4 のペプチドは 32 通り中 10 を占めた（**Table 2-8A**）。IgG の場合、含まれる位置による結合性の顕著な違いは見られなかった（**Table 2-8B**）。これらの解析結果から、アミノ酸を物

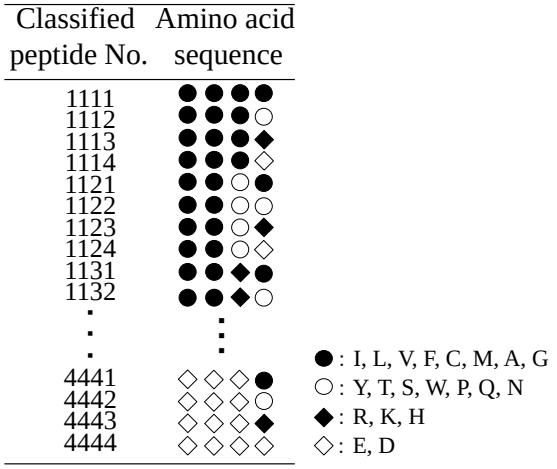
理化学的性質で分類することで、高結合性ペプチドや高結合性ルールを効率的に探索できると結論付けた。

本章では、IL-2 と IgG を標的分子とし、512 という少数の 4 残基ペプチドからの高結合性ペプチドの探索に成功した。アミノ酸の物理化学的性質から探索用のライブラリーを戦略的に構築することで、各標的分子に対する高結合性ペプチド、及びそのルールを得ることができた。従って、本手法は機能性ペプチドの開発に有用である。

(A)



(C)



(B)

group	1 ●	2 ○	3 ◆	4 ◇
character	High hydrophobicity	Low hydrophobicity	Positive charge	Negative charge
amino acid	I	Y	R	E
	L	T	H	D
	V	S	K	
	F	W		
	C	P		
	M	Q		
	A	N		
	G			

Fig. 2-1　物理化学的性質を利用した 20 種類のアミノ酸の分類　(A)のグラフは、各アミノ酸の等電点と疎水度の分布を表している。等電点においては、正電荷と負電荷を分けるために、20 アミノ酸分の平均値で標準化している。このグラフから、20 種類のアミノ酸を高疎水度（緑）、低疎水度（黄色）、正電荷（青）、負電荷（赤）の 4 group に分類した。　(B)は各 group を構成するアミノ酸の一覧を表している。高疎水度（group 1）は I、L、V、F、C、M、A、G を、低疎水度（group 2）は Y、T、S、W、P、Q、N を、正電荷（group 3）は H、R、K を、負電荷（group 4）は E、D をから構成されている。　(C)は、4 つの物理化学的性質を全て網羅した 4 残基ランダムペプチドライブラリーの概略図を表している。この 4 残基ランダムペプチドライブラリーには、上記の 4 group が同じ出現頻度で含まれている。

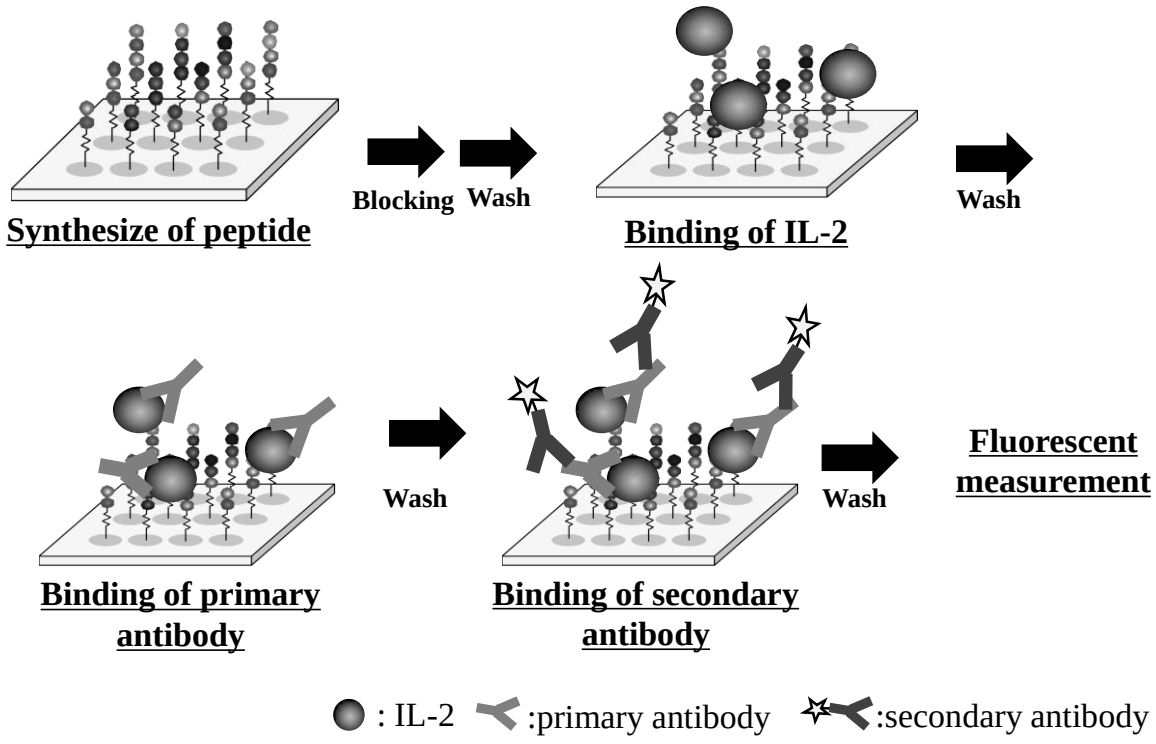


Fig. 2-2　目的タンパク質に高結合なペプチドの探索手法の概略図　Fmoc 固相合成法で作製したペプチドアレイを用いて、目的タンパク質に対して高結合性を示すペプチドの探索を行った。ペプチドのスポットに結合した目的タンパク質量は、目的タンパク質に対する一次抗体と、蛍光標識した二次抗体を用いて、蛍光強度から評価した。

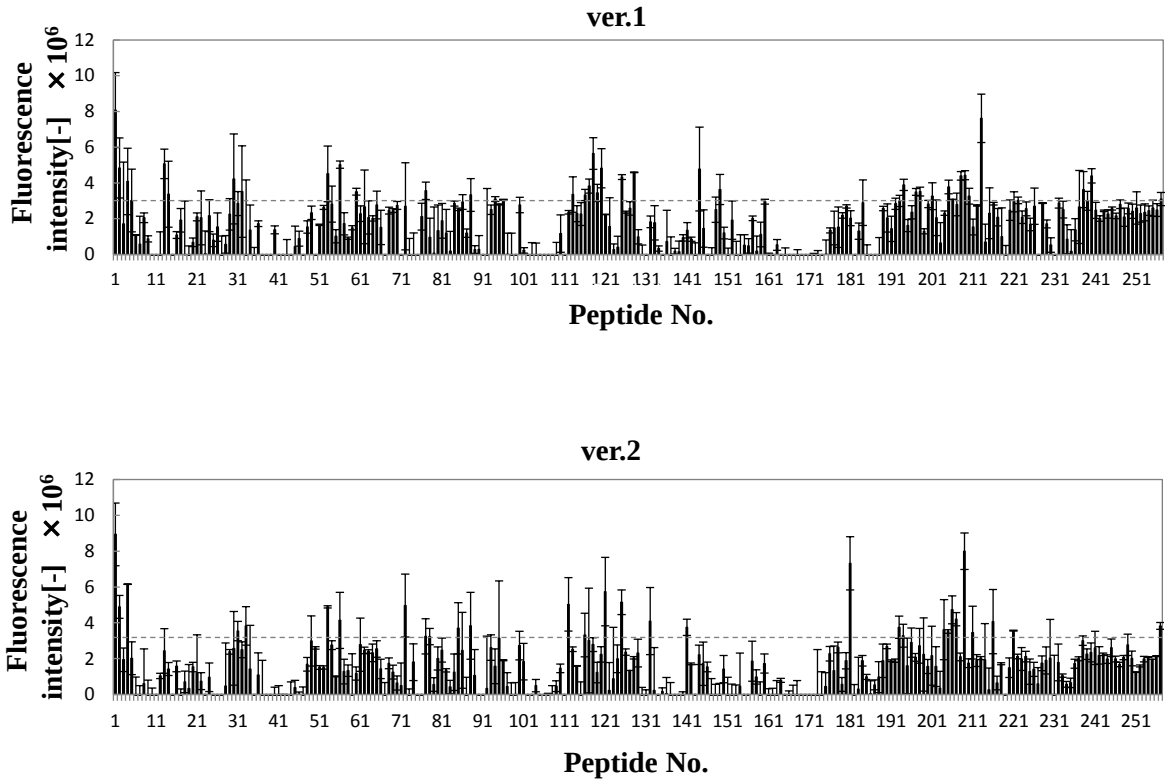


Fig. 2-3　探索した IL-2 結合ペプチドの蛍光強度値　蛍光強度は、4 残基ランダムペプチドライブラリーへの IL-2 の結合実験から得た。ペプチドライブラリーは ver.1 及び ver.2 の 2 組を作製し、各組はそれぞれ異なる 256 種のペプチドで構成されている。グラフ中の破線は、IL-2 に対する高結合ペプチドとしての閾値を表し、蛍光強度値としてはそれぞれ ver.1 で 2.5×10^6、ver.2 で 2.7×10^6 である。

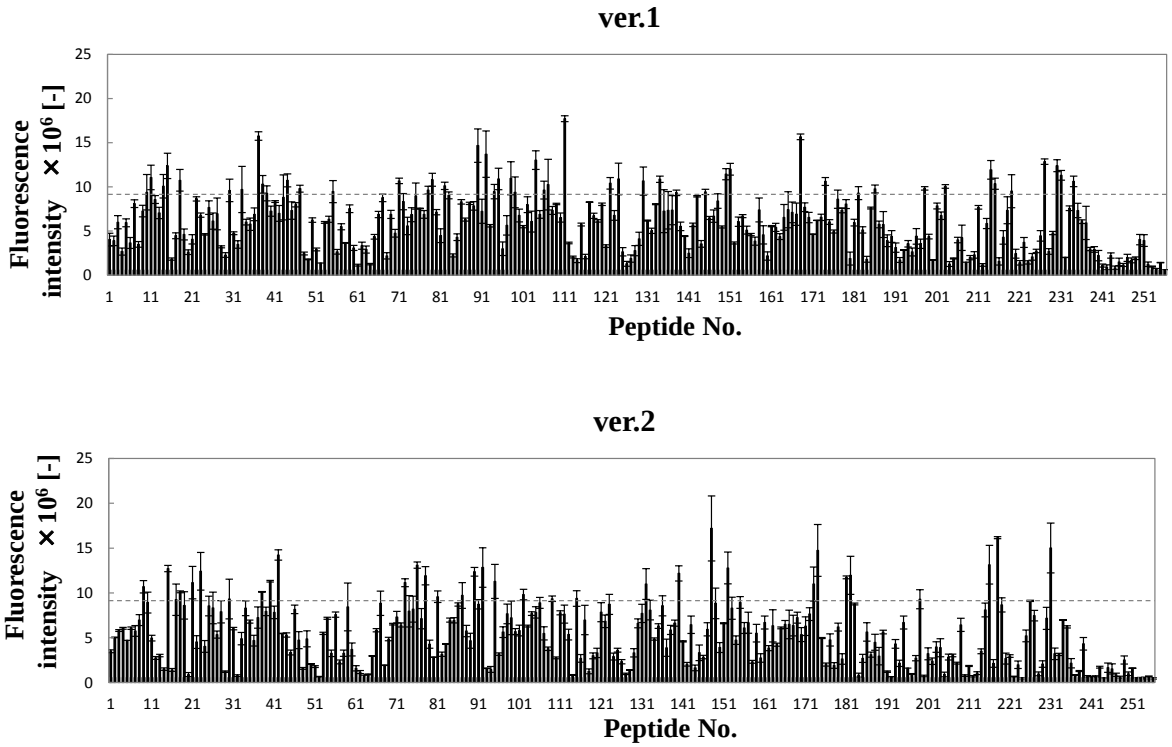


Fig. 2-4　探索した IgG 結合ペプチドの蛍光強度値　蛍光強度は、4 残基ランダムペプチドライブラリーへの IgG の結合実験から得た。ペプチドライブラリーは ver.1 及び ver2 の 2 組を作製し､各組はそれぞれ異なる 256 種のペプチドで構成されている。グラフ中の破線は、IgG に対する高結合ペプチドとしての閾値を表し、蛍光強度値としてはそれぞれ ver.1 で 9.3×10^6、ver.2 で 8.9×10^6 である。

Table 2-1　物理化学的性質を利用した 20 種類のアミノ酸の一覧

(A) ver.1

Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group
IVFF	1111	PGIL	2111	KGIM	3111	EGIC	4111
VILW	1112	QFVS	2112	HFFN	3112	EILN	4112
GCVH	1113	WFFH	2113	RVLR	3113	EMVH	4113
IMIE	1114	QMLE	2114	RVVE	3114	DCFD	4114
IFWC	1121	PVPF	2121	HFNL	3121	DLPI	4121
MVSQ	1122	TCNT	2122	HMYW	3122	EAWY	4122
VIPR	1123	YAQR	2123	RISR	3123	DCTK	4123
VCQE	1124	TLYD	2124	RCTD	3124	EISE	4124
GGHL	1131	QMHM	2131	HMKF	3131	DGHF	4131
IGKQ	1132	SART	2132	HLHN	3132	DFKQ	4132
LARH	1133	QCRR	2133	KCRK	3133	DVRH	4133
VFKD	1134	NLKD	2134	KAHE	3134	DMKE	4134
FLDV	1141	YVEV	2141	HGEM	3141	DFEM	4141
FLEY	1142	YGDP	2142	KAEY	3142	EVDW	4142
FMDH	1143	WIDK	2143	RIDH	3143	EADR	4143
CAEE	1144	WIEE	2144	HLDD	3144	DLED	4144
LPAV	1211	TQAA	2211	HYAA	3211	DTCA	4211
AWCN	1212	SWGQ	2212	KWGT	3212	DPGT	4212
ASMK	1213	WYCK	2213	HNMK	3213	EWMK	4213
CTGD	1214	SSMD	2214	RNCE	3214	ENAD	4214
VTTV	1221	STPV	2221	HTQL	3221	EWTI	4221
LPYN	1222	NQWS	2222	HQPY	3222	EYYY	4222
CTNH	1223	PPSK	2223	HSWH	3223	DYQH	4223
ISSD	1224	TYTD	2224	KQND	3224	DSNE	4224
GYHI	1231	YTRM	2231	RYKA	3231	DNKL	4231
ANRP	1232	YWHQ	2232	RPRS	3232	EQRS	4232
CYRK	1233	QWKR	2233	KTHK	3233	DQRR	4233
MNKE	1234	YNHE	2234	RPKE	3234	ESHD	4234
GQEC	1241	YPEG	2241	HNDG	3241	ETDL	4241
LWDQ	1242	WSDN	2242	KWES	3242	DPDW	4242
VSDK	1243	NNER	2243	KQDH	3243	ETEK	4243
FQEE	1244	NPDE	2244	HSED	3244	DYEE	4244

CHFG	1311	SKFM	2311	KRFV	3311	DKIM	4311
MHLP	1312	WHVQ	2312	RRVT	3312	DHVP	4312
AKVR	1313	NRLR	2313	KKIK	3313	DHFR	4313
VRID	1314	THID	2314	RRLE	3314	DKLD	4314
FHNC	1321	PKTG	2321	KHSF	3321	EKQI	4321
FKPP	1322	PRNY	2322	HKYY	3322	DRPW	4322
LHQH	1323	YKQK	2323	RHTH	3323	EHWK	4323
LKWE	1324	QRYD	2324	HHWE	3324	DKSE	4324
IKHL	1331	QKKF	2331	HHRL	3331	DHHA	4331
GKHS	1332	WHKT	2332	HKRY	3332	ERHP	4332
ARRR	1333	NRHR	2333	KKKH	3333	EKRR	4333
FHKE	1334	SRRE	2334	KHHD	3334	ERKE	4334
LREM	1341	YKEG	2341	KRDG	3341	DRDA	4341
LRDT	1342	THDP	2342	HKDY	3342	DHDT	4342
IRDR	1343	YHEH	2343	KREK	3343	EHEK	4343
MHEE	1344	PKDD	2344	KRED	3344	DRED	4344
ADMV	1411	TECG	2411	RDGC	3411	EDAC	4411
CEAW	1412	PEMQ	2412	REAN	3412	EEMN	4412
MDGH	1413	QEAR	2413	RDCH	3413	DDGH	4413
GECE	1414	SDGD	2414	KDME	3414	DDCD	4414
VEWV	1421	WESI	2421	RENC	3421	EETI	4421
FEST	1422	NDPP	2422	RDYS	3422	EESQ	4422
GDYR	1423	TDQR	2423	HEPK	3423	DDNK	4423
IDTD	1424	NDWE	2424	HEQD	3424	EEYE	4424
MEKF	1431	SDKA	2431	REHG	3431	EDKI	4431
MDKS	1432	SDRW	2432	REHW	3432	EEKW	4432
GDHR	1433	QERK	2433	KDRH	3433	EERH	4433
AERE	1434	WEHD	2434	RDKD	3434	EDHD	4434
MDEI	1441	TEEF	2441	REDC	3441	EDDA	4441
AEEW	1442	PEDS	2442	REEP	3442	DEEN	4442
CEDR	1443	PDEH	2443	KDEK	3443	EEDR	4443
CDDD	1444	NDDD	2444	KDDE	3444	DDEE	4444

(B) ver.2

Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group	Sequence	Categorized group
MVLF	1111	SLVA	2111	KIIV	3111	EFLG	4111
ILFS	1112	PLFY	2112	RMFT	3112	DCIQ	4112
CVVR	1113	WAIR	2113	HGVR	3113	DGVR	4113
FIID	1114	SALE	2114	HFLD	3114	DMFD	4114
GCQG	1121	QINC	2121	HCNV	3121	DISM	4121
FMPQ	1122	PVYN	2122	KLSP	3122	EFTT	4122
IMSK	1123	SFPH	2123	HVTH	3123	EAWH	4123
CAWE	1124	NCQE	2124	RIYD	3124	EMPE	4124
VFRC	1131	YIHG	2131	KMKA	3131	EGHL	4131
MCKY	1132	NCKP	2132	KVRS	3132	EVKQ	4132
AGKH	1133	YVRR	2133	HGHK	3133	DAKK	4133
MAHE	1134	YGRE	2134	HFHE	3134	EIRD	4134
MIDC	1141	NMEC	2141	HLEI	3141	DCDA	4141
GGEP	1142	WFDT	2142	HAEN	3142	DLEY	4142
VFER	1143	TMER	2143	RADH	3143	DVDR	4143
ALDD	1144	YGDE	2144	HCDD	3144	DLEE	4144
CYGA	1211	WSCV	2211	HTAA	3211	EWAI	4211
MQAW	1212	QTGN	2212	KNMP	3212	EQMQ	4212
LSCH	1213	SPAH	2213	KTGR	3213	DTCH	4213
ATME	1214	QWMD	2214	RWCD	3214	ESGE	4214
IWSC	1221	NYPL	2221	RSWF	3221	ETTA	4221
LNNP	1222	WNWW	2222	HQQQ	3222	EYQP	4222
GPYR	1223	WNTK	2223	RYPK	3223	EPNR	4223
FSTD	1224	SYSD	2224	RYNE	3224	DWYD	4224
GPRM	1231	SSHA	2231	KWHV	3231	DPKM	4231
VYKY	1232	QTKT	2232	KQKY	3232	DYHY	4232
GQHK	1233	WPRR	2233	HPRH	3233	DNRK	4233
LTRD	1234	TWHE	2234	RSKD	3234	DQRE	4234
MSDA	1241	SQDV	2241	HNEF	3241	DYDL	4241
VWES	1242	PPEQ	2242	KPDQ	3242	DNDT	4242
LTER	1243	NWDH	2243	RNDK	3243	ESER	4243
MNDE	1244	YQED	2244	RQEE	3244	ETED	4244
IHIL	1311	TKFI	2311	KHFG	3311	DRIM	4311
CHLW	1312	TRIW	2312	KKVS	3312	ERFN	4312

FRVK	1313	WRLR	2313	RKLH	3313	DRLH	4313
AKFD	1314	NKVE	2314	KHID	3314	EKVE	4314
GRQF	1321	THNL	2321	RRTM	3321	EHSG	4321
LRPP	1322	YRQQ	2322	KHWN	3322	DHPY	4322
CRNR	1323	QHTK	2323	KKYR	3323	DHWR	4323
VHWE	1324	THYE	2324	RHSE	3324	DRQD	4324
CRHI	1331	THKF	2331	HRRC	3331	DKHM	4331
FHHQ	1332	SRHW	2332	KRKS	3332	EKRW	4332
FKKK	1333	PKRK	2333	HRHK	3333	EHHK	4333
VKRE	1334	PKKD	2334	RRRE	3334	EKKE	4334
IKEM	1341	WKEL	2341	HHDF	3341	EKDM	4341
VHEY	1342	PKDS	2342	HRDW	3342	DHEN	4342
AKDR	1343	QRDH	2343	RKEH	3343	ERDH	4343
GHDD	1344	NHED	2344	KKED	3344	EHED	4344
FEGL	1411	YEAI	2411	REMG	3411	DEMC	4411
IECN	1412	QDMT	2412	HEAN	3412	DECT	4412
ADAH	1413	WDGK	2413	RDCK	3413	EDAR	4413
AEME	1414	YDCD	2414	REGD	3414	DEGD	4414
LDYI	1421	YDPL	2421	HDYF	3421	EDTF	4421
IETW	1422	SDQS	2422	RDQW	3422	DDYP	4422
LESK	1423	PESK	2423	RENH	3423	EDSH	4423
FDWE	1424	QEWE	2424	KDPE	3424	DEND	4424
ADKG	1431	NEKI	2431	KEKG	3431	EERI	4431
LDKT	1432	PERT	2432	RDHS	3432	EDHN	4432
GDHR	1433	TDHR	2433	KEHK	3433	DEKK	4433
VERE	1434	QDRD	2434	HDRD	3434	EDKE	4434
CEDC	1441	NEDV	2441	RDEV	3441	EDEV	4441
IDDP	1442	TDDY	2442	HEDW	3442	DDES	4442
MEEH	1443	PEEK	2443	KEDH	3443	DEDH	4443
CDED	1444	YEEE	2444	KDEE	3444	EEDD	4444

結合実験に用いたペプチドライブラリーは ver.1 及び ver.2 の 2 組を作製した。各組はそれぞれ異なる 256 種のペプチドで構成されている。

Table 2-2　物理化学的性質の分類による細胞高接着性ペプチドの解析

(A)ランダムペプチドライブラリーにおける全 643 ペプチドの組成

	Number of amino acid residues including each group				
	Position in peptide sequence				
Group	P1	P2	P3	P4	P5
1	246 (0.38)	249 (0.39)	278 (0.43)	240 (0.37)	243 (0.38)
2	236 (0.37)	220 (0.34)	205 (0.32)	239 (0.37)	220 (0.34)
3	105 (0.16)	107 (0.17)	93 (0.14)	99 (0.15)	105 (0.16)
4	56 (0.09)	67 (0.10)	67 (0.10)	65 (0.10)	75 (0.12)

(B)細胞高接着ペプチドの上位 30 配列の組成

	Number of amino acid residues including each group				
	Position in peptide sequence				
Group	P1	P2	P3	P4	P5
1	9 (0.30)	10 (0.33)	9 (0.30)	14 (0.47)	8 (0.27)
2	9 (0.30)	8 (0.27)	11 (0.37)	10 (0.33)	9 (0.30)
3	12 (0.40)	11 (0.37)	8 (0.27)	6 (0.20)	12 (0.40)
4	0 (0.00)	1 (0.03)	2 (0.07)	0 (0.00)	1 (0.03)

探索した全ペプチド(A)及び細胞高接着ペプチドの上位 30 配列は、各残基(P)のアミノ酸を物理化学的性質から 4 つの group に分類することで区分けした。括弧内の数字は、全ペプチドに占める各残基中に各 group を含んだペプチドの割合を示している。P1 から P5 は、そのペプチドにおけるアミノ酸残基の位置を表している。例として、P1 は N 末端から数えて 1 番目のアミノ酸残基を表す。

Table 2-3　物理化学的性質の分類による胆汁酸高結合性ペプチドの解析

(A)ランダムペプチドライブラリーにおける全 2212 ペプチドの組成

	Number of amino acid residues including each group					
	Position in peptide sequence					
Group	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	877 (0.40)	879 (0.40)	856 (0.39)	872 (0.39)	874 (0.40)	890 (0.40)
2	797 (0.36)	817 (0.37)	784 (0.35)	810 (0.37)	755 (0.34)	785 (0.35)
3	330 (0.15)	307 (0.14)	343 (0.16)	346 (0.16)	349 (0.16)	307 (0.14)
4	208 (0.09)	209 (0.09)	229 (0.10)	184 (0.08)	234 (0.11)	230 (0.10)

(B)胆汁酸高結合性ペプチドの上位 40 配列の組成

	Number of amino acid residues including each group					
	Position in peptide sequence					
Group	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	12 (0.30)	11 (0.28)	8 (0.20)	19 (0.48)	17(0.43)	16 (0.40)
2	21 (0.53)	21 (0.53)	26 (0.65)	16 (0.40)	17 (0.43)	19 (0.48)
3	7 (0.18)	4 (0.10)	5 (0.13)	2 (0.05)	4 (0.10)	4 (0.10)
4	0 (0.00)	4 (0.10)	1 (0.03)	3 (0.08)	2 (0.05)	1 (0.03)

探索した全ペプチド(A)及び胆汁酸高結合性ペプチドの上位 40 配列は、各残基(P)のアミノ酸を物理化学的性質から 4 つの group に分類することで区分けした。括弧内の数字は、全ペプチドに占める各残基中に各 group を含んだペプチドの割合を示している。

Table 2-4　物理化学的性質の分類による ZnO 高結合性ペプチドの解析

(A)ランダムペプチドライブラリーにおける全 420 ペプチドの組成

	Number of amino acid residues including each group					
	Position in peptide sequence					
Group	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	173 (0.41)	153 (0.36)	175 (0.42)	178 (0.42)	165 (0.39)	180 (0.43)
2	146 (0.35)	144 (0.34)	139 (0.33)	145 (0.35)	158 (0.38)	140 (0.33)
3	55 (0.13)	68 (0.16)	59 (0.14)	59 (0.14)	58 (0.14)	67 (0.16)
4	46 (0.11)	55 (0.13)	47 (0.11)	38 (0.09)	39 (0.09)	33 (0.08)

(B)ランダムペプチドライブラリーにおける ZnO 高結合性ペプチドの上位 30 配列の組成

	Number of amino acid residues including each group					
	Position in peptide sequence					
Group	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	11 (0.37)	17 (0.57)	17 (0.57)	14 (0.47)	13 (0.43)	13 (0.43)
2	6 (0.20)	5 (0.17)	8 (0.27)	8 (0.27)	10 (0.33)	11 (0.37)
3	11 (0.37)	5 (0.17)	5 (0.17)	5 (0.17)	6 (0.20)	4 (0.13)
4	2 (0.07)	3 (0.10)	0 (0.00)	3 (0.10)	1 (0.03)	2 (0.07)

探索した全ペプチド(A)及び ZnO 高結合性ペプチドの上位 30 配列は、各残基(P)のアミノ酸を物理化学的性質から 4 つの group に分類することで区分けした。括弧内の数字は､全ペプチドに占める各残基中に各 group を含んだペプチドの割合を示している。

Table 2-5　IL-2(A)及び IgG(B)高結合性ペプチドの上位 50 配列の一覧

(A) IL-2

MVLF	1111	NEDV	2441
IVFF	1111	TEEF	2441
ILFS	1112	NDDD	2444
VILW	1112	HFLD	3114
FIID	1114	HLEI	3141
IMIE	1114	HLDD	3144
FLDV	1141	HTQL	3221
LWDQ	1242	HDYF	3421
LTER	1243	EFLG	4111
FQEE	1244	EILN	4112
IHIL	1311	DLPI	4121
LDYI	1421	EAWY	4122
VEWV	1421	EIRD	4134
IDTD	1424	DFEM	4141
FDWE	1424	DCDA	4141
AERE	1434	DLEY	4142
NCQE	2124	DVDR	4143
YVEV	2141	DLED	4144
NYPL	2221	EWAI	4211
SYSD	2224	DTCA	4211
NHED	2344	EWTI	4221
WESI	2421	DWYD	4224
NDPP	2422	DYDL	4241
NDWE	2424	DHDT	4342
NEKI	2431	DRED	4344

(B)

VFRC	1311	SDRW	2432
LARH	1133	WEHD	2434
VFER	1143	HFFN	3112
FMDH	1143	HFLD	3114
AWCN	1212	HMYW	3122
IWSC	1221	HFHE	3134
GPYR	1223	RWCD	3214
FHNC	1321	HQPY	3222
VHWE	1324	HSWH	3223
FHHQ	1332	RYNE	3224
FHKE	1334	HHWE	3324
YAQR	2123	HHDF	3341
YIHG	2131	HRDW	3342
YGRE	2134	HKDY	3342
WFDT	2142	HDYF	3421
WIDK	2143	RDQW	3422
YWHQ	2232	EYYY	4222
QTKT	2232	DYQH	4223
YNHE	2234	DWYD	4224
TWHE	2234	DYHY	4232
NWDH	2243	DHFR	4313
NNER	2243	DRPW	4322
WHVQ	2312	DHWR	4323
QRYD	2324	EHWK	4323
YHEH	2343	ERHP	4332

Table 2-6　IL-2(A)及び IgG(B)高結合性ペプチドの上位 50 配列における各物理化学 Group の組成

(A)　IL-2

	Number of amino acid residues including each group			
	Position in peptide sequence			
Group	P1	P2	P3	P4
1	16 (0.32)	22 (0.44)	12 (0.24)	23 (0.46)
2	12 (0.24)	11 (0.22)	16 (0.32)	8 (0.16)
3	5 (0.10)	4 (0.08)	3 (0.06)	2 (0.04)
4	17 (0.34)	13 (0.26)	19 (0.38)	17 (0.34)

(B)　IgG

	Number of amino acid residues including each group			
	Position in peptide sequence			
Group	P1	P2	P3	P4
1	11 (0.22)	13 (0.26)	6 (0.12)	6 (0.12)
2	16 (0.32)	17 (0.34)	19 (0.38)	17 (0.34)
3	14 (0.28)	16 (0.32)	15 (0.30)	14 (0.28)
4	9 (0.18)	4 (0.08)	10 (0.20)	13 (0.26)

括弧内の数字は、高結合上位 50 ペプチドに占める、各残基(P)中に各 group を含んだペプチドの割合を示している。

Table 2-7　物理化学的性質で分類した IL-2(A)及び IgG(B)高結合性ペプチドの平均蛍光強度

(A)　IL-2

		Double			
		Group			
Group	Single	1	2	3	4
1	1.38	1.54			
2	1.17	1.36	1.15		
3	0.54	0.58	0.31	−0.47	
4	1.81	2.05	1.90	1.21	2.50

Unit is $\times 10^6$ a.u. The average fluorescent intensity was 1.23×10^6 a.u.

(B)　IgG

		Double			
		Group			
Group	Single	1	2	3	4
1	5.58	5.50			
2	6.18	6.03	7.00		
3	6.44	6.47	7.19	7.06	
4	4.95	4.70	5.45	5.83	2.44

Unit is $\times 10^6$ a.u. The average fluorescent intensity was 5.66×10^6 a.u.

「Single」はある group を配列中に少なくとも一つ含むペプチド、「Double」はある group の組み合わせを配列中に少なくとも一組含むペプチドを表している。欄内の数字は、ペプチドの平均蛍光強度を表している。

Table 2-8　IL-2 (A)及び IgG (B)結合ペプチドの上位 50 配列における二つの物理化学的特徴を持つペプチド数

(A)　IL-2

Group 1 & Group 4		Position of Group 1 in peptide sequence			
		P1	P2	P3	P4
Position of Group 4 in peptide sequence	P1	-	10	4	8
	P2	5	-	0	7
	P3	4	9	-	8
	P4	6	7	3	-

Group 2 & Group 4		Position of Group 2 in peptide sequence			
		P1	P2	P3	P4
Position of Group 4 in peptide sequence	P1	-	5	4	4
	P2	7	-	8	1
	P3	5	4	-	4
	P4	5	3	6	-

Group 4 & Group 4		Position of Group 4 in peptide sequence			
		P1	P2	P3	P4
Position of Group 4 in peptide sequence	P1	-			
	P2	0	-		
	P3	8	3	-	
	P4	4	5	6	-

(B) IgG

Group 2 & Group 3		Position of Group 3 in peptide sequence			
		P1	P2	P3	P4
Position of Group 2 in peptide sequence	P1	-	3	8	5
	P2	4	-	5	5
	P3	7	7	-	6
	P4	6	6	6	-

Group 3 & Group 3		Position of Group 3 in peptide sequence			
		P1	P2	P3	P4
Position of Group 3 in peptide sequence	P1	-			
	P2	4	-		
	P3	1	3	-	
	P4	1	4	1	-

2.4 結言

標的タンパク質に高結合性を示すペプチドを効率的・戦略的に探索するために、20 種のアミノ酸をタンパク質間の相互作用に重要な 4 つの物理化学的性質で分類し、本性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーを作製した。本手法によって探索候補のペプチド数を、性質分類前の 160,000 から 256 に減らすことができた。更に、本ライブラリーを用いて、2 種の標的タンパク質（IL-2 と IgG）における個々の高結合性ルールを見付けた。従って、本ライブラリーは標的タンパク質の結合性評価において十分なペプチド数を有しており、本手法は様々な標的タンパク質のペプチド性リガンドの開発における簡便で戦略的な手法として有用であると言える。更に、本手法は IL-2 や IgG などの炎症性物質に関連する疾患の予測や診断に応用できる可能性がある。

2.5 参考文献

1. R Frank., Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*. 48: 9217-9232 (1992).
2. PE Collins, G Grassia, A Colleran, *et al*., Mapping the interaction of B Cell leukemia 3 (Bcl-3) and nuclear factor κB (NF-κB) p50 identifies a Bcl-3-mimetic anti-inflammatory Peptide. *Journal of Biological Chemistry*. 290: 15687-15696 (2015).
3. F Chesnel, P Hascoet, JP Gagné, *et al*., The von Hippel–Lindau tumour suppressor gene: uncovering the expression of the pVHL172 isoform. *British Journal of Cancer*. 113: 336-344 (2015).
4. T Vernet, L Choulier, Y Nominé, *et al*., Spot peptide arrays and SPR measurements: throughput and quantification in antibody selectivity studies. *Journal of molecular recognition.* 28: 635-644 (2015).
5. R Kato, M Kunimatsu, S Fujimoto, *et al*., Angiotensin II inhibitory peptide found in the receptor sequence using peptide array. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 315: 22-29 (2004).
6. M Okochi, M Nakanishi, R Kato, *et al*., High-throughput screening of cell death inducible short peptides from TNF-related apoptosis-inducing ligand sequence. *Febs Letters*. 580: 885-889 (2006).
7. C Kaga, M Okochi, M Nakanishi, *et al*., Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362: 1063-1068 (2007).
8. T Ochiai, T Sugita, R Kato, *et al*., Screening of an alpha-amylase inhibitor peptide by photolinker-peptide array. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 76: 819-824 (2012).
9. C Kaga, M Okochi, Y Tomita, *et al*., Computationally assisted screening and design of

cell-interactive peptides by a cell-based assay using peptide arrays and a fuzzy neural network algorithm. *Biotechniques*. 44: 393-402 (2008).

10. T Takeshita, M Okochi, R Kato, *et al*., Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 112: 92-97 (2011).
11. M Okochi, M Ogawa, C Kaga, *et al*., Screening of peptides with a high affinity for ZnO using spot-synthesized peptide arrays and computational analysis. *Acta Biomaterialia*. 6: 2301-2306 (2010).
12. A Szenczi, J Kardos, GA Medgyesi, *et al*., The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals*. 34: 5-14 (2006).

第 3 章

4 残基ペプチドの主成分分析を元にした 8 残基ペプチドにおける高結合性特性の探索

3.1 はじめに

ペプチドは生体の機能に最も重要な分子の一つであり、生体内の複雑な反応を調節している。これまでに、様々な分子に結合するペプチドが報告され、予測診断や生体分子の可視化、ペプチド性タグ、ペプチド性リガンドといった生物学的研究における様々な分野で利用されている[1-11]。こうした機能性ペプチドは、配列の多様性が無数に存在するため、精密な分子設計と、合理的な探索手法が必要である。

近年では、こうした機能性ペプチドの探索や開発のために、ペプチドライブラリーの構築法が注目されている。例えば、ファージディスプレイ法[12]や、コンビナトリアルースプリット合成法[13]、ビーズディスプレイ法[14]等が、最も強力で一般的なツールとして知られているが、これらの手法は全てポジティブスクリーニングに基づいた探索法である[15-18]。そのため、こうした手法で得られたライブラリーの結合性結果に基づいて、機能性ペプチドの特徴を解析することは困難である。

機能性ペプチドを探索するためのライブラリーの多くには、長鎖のペプチドが含まれている。ペプチド鎖が長ければ標的タンパク質との相互作用が強まることから、

機能性ペプチドの探索では一般的により長鎖のペプチドが有利であるためである。例えば、抗体結合ペプチドは13-16残基[19]、I型MHC結合ペプチドは9-10残基である[20]。しかしながら、例えば20種のアミノ酸で作製できる4残基ペプチドの全組み合わせは16万通り、8残基ペプチドでは256億通りと、残基数に従って膨大な量になる。これを全て合成し、結合性を評価するのは、現実的ではない。従って、有用なペプチドの探索には、探索元となる候補ペプチドのライブラリーを、効率的で戦略的に絞り込んで構築できる手法が重要である。

有用なペプチドの探索を効率化する上で、標的分子との結合に関与する物理的、化学的な特徴を抽出する研究がなされてきた[21-26]。近年では、当研究室でも固相合成したペプチドアレイからの結合性データと、物理化学的特徴の計算解析を併用したペプチド探索法を開発し、胆汁酸、細胞死受容体への結合ペプチドや、細胞接着ペプチドを発見してきた[27, 28]。また、前章のように、20種のアミノ酸を物理化学的性質から4つのgroupに分類し、その4 groupを網羅する4残基ペプチドライブラリーを構築することで、ライブラリーサイズを512ペプチドまで縮小できた[29]。これらの研究を通じて、本章では4残基という短鎖ペプチドでも、標的分子によって結合するペプチドの物理化学的性質が異なることを見出し、ペプチドアレイへの結合性情報と、ペプチドの物理化学的性質の情報を組み合わせた、効率的で戦略的な探索手法を開発した。

しかし、本手法は4残基のペプチドにしか用いておらず[29]、またペプチドの残基数によって、解析に用いる物理化学的指標を最適化する必要があった。更に、4 groupへの分類に基づいた手法においても、仮に4残基を2倍の残基数に伸長させたとすると、ライブラリー内のペプチド数は256倍になってしまう（$256 = 4^4$から$65{,}536 = 4^8$）。従って、長鎖ペプチドにおいても、より少数の候補ペプチドで構築されたライブラリーを用いて、効率的で戦略的に有用ペプチドを探索することが必要である。

主成分分析は、情報の欠落なく次元を圧縮する演算手法であり、近年では遺伝子発現解析などの生物学的研究に組みこまれている[30]。次元の圧縮は、「主成分

（principal components：PCs）」と呼ばれるその現象において支配的な変数を特定することで行われる。主成分分析によって、PC1やPC2といった、元々の変数の一次結合させた新しい変数が得られる。ここで、ペプチドの物理化学的性質が元々の変数であったと仮定すると、主成分分析によって、次元を圧縮して解析が可能になる。主成分プロットにおいては、良く似た性質を持つ２つのペプチドは、おおよそ同じところにプロットされる。また、本分析手法には、ペプチドの物理化学的性質である各アミノ酸残基個々の極性や電荷、疎水性、分子量だけでなく、ペプチド全体の平均値や最大値、最小値といった多種の特徴を使用できる。しかし、こうしたペプチドの多様な次元は、解析を複雑で困難にしている。

最初にペプチドの結合強度において重要な変数を選択し、次いで重要な変数を含む組み合わせモデルを構築して結合強度を予測すれば、標的タンパク質に対する高結合性ペプチドの解析が達成できると考えられる。しかし、これまでに当研究室が実施してきた主成分分析を用いない手法では、こうした解析において「真に重要な変数が、限られたデータから正確に選び出された」という保証を常に得られた訳ではなかった。従って、元々の巨大なポピュレーションに対して、ごく少数のサンプルしか利用できない場合は、教師あり学習による変数の選択がとても困難であった。その点、主成分分析は、重要な変数を選び出すのではなく、変数を 2 つの主成分に集約してしまうことで、高結合性ペプチドの特徴が容易に理解できるようになるため、主成分分析によって情報の損失なしに次元が圧縮できることは非常に魅力的である。

そこで本章では、機能性ペプチドの特徴を戦略的に解析できるモデル構築を目指し、以下の手法を採用した。ペプチドのアミノ酸配列における主成分分析を、予め設計した短いペプチドライブラリーに対して行い、2 つの主成分を同定した。その際、使用する変数は、N 末端から X 残基目という位置の情報は使わず、疎水度や電荷の最大値や最小値といった変数のみとし、ペプチド配列が拡張されても適用できるようにした。次に、そのペプチドライブラリーの標的タンパク質に対する結合性を評価した。2 つ

の主成分で構成された主成分プロットにおける高結合性ペプチドの領域を得た後、その領域の特徴をより大きなペプチドライブラリーの検索のために使用し、ペプチドの配列と機能の関連を評価した。実際に、512 ペプチドを含む 4 残基ペプチドライブラリーから主成分を抽出し、ペプチドの物理化学的性質と関連する変数を 2 つの主成分に圧縮した。本章では IL-2 と IgG をモデルタンパク質とし、512 ペプチドを含むペプチドアレイを用いて両タンパク質への結合親和性を評価した。結合性データを主成分プロット上に展開した場合、IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数で主成分分析すると、高結合性ペプチドが主成分プロットにおけるある一定の領域に濃縮できた。更に、主成分分析で抽出した 4 残基ペプチドの結合性ルールから、IL-2 及び IgG に対する 8 残基ペプチドの結合性も評価した。そこで得られた 8 残基ペプチドの結合性について考察する。

3.2 実験方法

3.2.1 ペプチドアレイの作製

ペプチドアレイは、上記 2.2.1 と同様に合成した。

3.2.2 ペプチドライブラリーの構築

4 残基ペプチドのライブラリーは、上記 2.2.2 と同様に作製した。本ライブラリーは、アミノ酸の物理化学的性質を 4 つの group に分類した際に、その 4 group を全て含むランダムペプチドライブラリーである。全 512 のペプチドから成り、その一覧を **Table 3-1** に示す。

IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドライブラリーにおいては、ヒト IL-2 受容体の細胞外ドメイン由来のアミノ酸配列を、8 残基ずつ 2 残基ずらしで切断したものである。全 234 のペプチドから成り、その配列の一覧を **Table 3-2** に示す。ヒト IL-2 受容体の α 鎖（P01589）及び β 鎖（P14784）のアミノ酸配列情報は、タンパク質情報データベ

ースである Universal Protein Resource（http://www.uniprot.org/）から得た。

新規 8 残基ペプチドライブラリーにおいては、上記 4 残基ペプチドライブラリーからランダムに選択した 2 つのペプチドをタンデムに繋げることで作製した。全 640 のペプチドから成り、その配列の一覧を **Table 3-3** に示す。

3.2.3 ペプチドアレイを用いた結合アッセイ

目的タンパク質である IL-2 及び IgG に対する結合実験は、以下のように行った。上記方法で合成したペプチドアレイを phosphate-buffered saline（PBS、pH 7.0）で数回洗浄し、最終脱保護剤を除去した。次いで、1%の Block Ace Powder（DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan）を含む PBS 溶液中で 1 時間浸漬し、非特異吸着を抑制した。0.05%の Tween-20（T-PBS）を含む PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、そのペプチドアレイを 130 nM の IL-2 を含む PBS 溶液に入れ、小型回転撹拌機（NR-3, Taitec Corporation, Saitama, Japan）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の IL-2 は 0.01%の T-PBS での 5 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。続いて、IL-2 に対する一次抗体（ab9618, Abcam, Cambridge, UK）と 0.25%の Block Ace Powder を含む PBS 溶液にペプチドアレイを入れ、小型回転撹拌機（NR-3）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の一次抗体は 0.01%の T-PBS での 5 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。更に、Alexa 48 が修飾された二次抗体（ab150117, Abcam）と 0.25%の Block Ace Powder を含む PBS 溶液にペプチドアレイを入れ、小型回転撹拌機（NR-3）を用いて 55 rpm で回転撹拌しながら 37°C で 2 時間反応させた。未結合の一次抗体は 0.01%の T-PBS での 10 分間の洗浄を 3 回行うことで除去した。

各ペプチドスポットの 494/519 nm の蛍光強度は、Typhoon FLA-9500（GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK）を用いて測定し、ImageQuantTL（GE Healthcare Life）を用いて定量化した。各ペプチドへの IL-2 及び IgG の結合量は、各ペプチドスポッ

トの蛍光強度から次式を用いて算出した。

IL-2：（IL-2、一次抗体、二次抗体添加時のペプチドスポットの蛍光強度）－（一次抗体、二次抗体添加時のペプチドスポットの蛍光強度）

IgG：（一次抗体、二次抗体添加時のペプチドスポットの蛍光強度）

3.2.4 主成分分析

主成分分析は R 言語によるプログラミング、及び **Table 3-4** に示す変数を用いて行った。用いた変数には、ペプチドの等電点[31]や、疎水性指標[32]、極性[31]、構造安定性における側鎖の寄与[34]、分配係数、分子量[35]、ペプチド中の物理化学的グループの数[29]、Pk1 と Pk2[34]が含まれている。変数である PC1 や PC2 の寄与率、及びその累積寄与率も、同様に主成分分析から算出した。

主成分分析によって、標的タンパク質である IL-2 や IgG とペプチドとの結合を最も説明する変数を抽出するために、変数を 49 から 9 まで変化させた No.1 から No.16 の主成分分析を行った。その中から、まず PC1 と PC2 の累積寄与率が高かった No.10、No.11、No.14、No.16 を、IL-2 や IgG とペプチドとの結合を説明する変数の候補として選択した。次に、ペプチドの蛍光強度と PC1、及びペプチドの蛍光強度と PC2 との相関係数を計算し、IL-2 に関しては No.10（18 変数）を、IgG に関しては No.11（16 変数）を、それぞれ相関係数の高い変数をして選択した。

3.2.5 IL-2 及び IgG における高結合性ルールと低結合性ルールの抽出

4 残基ペプチドライブラリーや IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリー、新規 8 残基ペプチドライブラリーにおける、IL-2 及び IgG への高結合性ルールと低結合性ルールは、いずれも 4 残基ペプチドライブラリーの主成分分析における主成分スコアから決定した。

まず、4 残基ペプチドライブラリーにおいて、各標的タンパク質への結合性（蛍光

強度）が大きい 20 ペプチド（Top 20）と小さい 20 ペプチド（Bottom 20）を選出し、それらの主成分スコアにおける平均値と標準偏差（SD）をそれぞれ算出する。IL-2 に関しては No.10 の 18 変数を、IgG に関しては No.11 の 16 変数を用いて、それぞれ主成分分析した際の主成分スコアを用いた。この際の PC1 と PC2 で規定される主成分平面において、PC1 軸座標が Top 20 の平均値＋SD から平均値－SD、PC2 軸座標が Top 20 の平均値＋SD から平均値－SD に相当する区画を「高結合ルール」と定義し、主成分スコアが本区画に含まれるペプチドを「高結合ペプチド」とした。同様に、PC1 軸座標が Bottom 20 の平均値＋SD から平均値－SD、PC2 軸座標が Bottom 20 の平均値＋SD から平均値－SD に相当する区画を「低結合ルール」と定義し、主成分スコアが本区画に含まれるペプチドを「低結合ペプチド」とした。

次に、IL-2 受容体由来と新規の 8 残基ライブラリーに含まれるペプチドも、同様に IL-2 では 18 変数を、IgG では 16 変数を用いて主成分スコアを算出し、上記の 4 残基ペプチドライブラリーで構築した「高結合ルール」及び「低結合ルール」に含まれるペプチドをそれぞれ「高結合ペプチド」及び「低結合ペプチド」とした。比較対象として、どちらのルールにも含まれない領域を「中結合性ルール」とした。各ルールに含まれるペプチドにおける主成分スコアの平均や SD、個数を **Table 3-1**、**3-2** に示す。

3.3 実験結果

3.3.1 各標的タンパク質の主成分分析における変数の決定

4 残基ペプチドライブラリー（全 512 ペプチド）に対して、ペプチドにおける 49 の物理化学的変数を用いた主成分分析を行い、標的タンパク質に対して高結合性のペプチドと低結合性のペプチドを判別できる主成分を抽出した（**Table 3-4**）。モデルの標的タンパク質として IL-2 及び IgG を用い、これらに対する結合性上位 20 位、下位 20 位の蛍光強度値を示すペプチドを、それぞれ高結合性ペプチド、低結合性ペプチドとした。IL-2 や IgG 結合ペプチドに最も適した変数を探索するために、変数を 49

から 9 まで変化させて主成分分析を行った（No. 1-16、**Table 3-4**）。その中で、主成分スコアの累積寄与率が高い変数の数を、最適な変数の数とした。

その結果、累積寄与率が 18 変数の No. 10、16 変数の No. 11、16 変数の No. 13、13 変数の No. 14、9 変数の No. 16 において、0.56、0.62、0.57、0.64、0.67 と高かったため、これらの 5 種を候補変数とした（**Table 3-4**）。また、No. 10、11、14、16 においては、IL-2 及び IgG の高結合性及び低結合性ペプチドを判別できる傾向にあった（**Fig. 3-1A、3-2A、3-3A、3-4A**）。しかし、No. 13 においてはこれらを判別できなかったため、候補から除外した（data not shown）。

次に、上記 4 候補の中で、蛍光強度値と主成分（PC1、PC2）との相関係数を比較し、高いものを各標的タンパク質の主成分分析に適した変数とした。その結果、PC1 と蛍光強度値との相関係数は、４つの変数条件において IL-2 と IgG の両方共に低かった一方で、PC2 は蛍光強度値とは相関する傾向にあった（**Fig. 3-1B、3-2B、3-3B、3-4B**）。PC2 と蛍光強度値との相関係数は、IL-2 の場合 0.46（16 変数、**Fig. 3-1B**）、0.39（13 変数、**Fig. 3-4B**）、0.36（9 変数、**Fig. 3-3B**）、0.21（18 変数、**Fig. 3-2B**）であり、16 変数が最も PC2 と蛍光強度値との相関が高かった。この PC1 は疎水度や極性、分配係数と、PC2 は等電点や group 3 の残基数、group 4 の残基数との相関が強かった。

IgG の場合、PC2 と蛍光強度値の相関係数は、0.35（18 変数、**Fig. 3-2D**）、0.25（16 変数、**Fig. 3-1D**）、0.24（13 変数、**Fig. 3-4D**）、0.21（9 変数、**Fig. 3-3D**）であり、18 変数が最も PC2 と蛍光強度値との相関が高かった。従って、主成分分析に用いる変数は、IL-2 は No.11 の 16 変数、IgG は No.10 の 18 変数に決定した。この PC1 は分配係数や疎水度、極性、側鎖のエントロピーと、PC2 は分子量や等電点、側鎖のエントロピーとの相関が強かった。

3.3.2 4 残基ペプチドライブラリーにおける主成分分析を用いた高結合性及び低結合性ルールの決定

高結合性、低結合性ルールを作成するために、上記の 16 変数（IL-2）や 18 変数（IgG）を用いて、4 残基ペプチドライブラリーの主成分スコアを算出した。ここから結合性上位 20 ペプチドと下位 20 ペプチドのスコアの平均と標準偏差を算出し、主成分プロットにおいて、結合性上位 20 ペプチドの「平均＋標準偏差」から「平均－標準偏差」で規定される領域を高結合性ルールと定義した。同様に、結合性下位 20 ペプチドの「平均＋標準偏差」から「平均－標準偏差」で規定される領域を低結合性ルールと定義した（**Fig. 3-5**）。

その結果、IL-2 においては、16 変数での主成分プロットにおける PC1 が-6.28 から 1.23、PC2 が 0.334 から 2.51 の領域を高結合性ルール、PC1 が-1.09 から 2.74、PC2 が -3.11 から-0.762 の領域を低結合性ルールとした（**Fig. 3-5A**）。同様に、IgG においては、18 変数での主成分プロットにおける PC1 が-1.44 から 1.19、PC2 が-3.13 から-0.837 の領域を高結合性ルール、PC1 が 0.531 から 4.04、PC2 が 0.920 から 3.29 の領域を低結合性ルールとした（**Fig. 3-5B**）。

3.3.3 IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ペプチドの解析

IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドライブラリー（全 234 ペプチド）から、IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数での主成分分析を用いて高結合性及び低結合性ペプチドを選出した（**Fig. 3-6A、3-6C**）。その結果、IL-2 では 59 の高結合性ペプチド（全 234 ペプチドの 25%）と 47 の低結合性ペプチド（全 234 ペプチドの 20%）、IgG では 31 の高結合性ペプチド（全 234 ペプチドの 13%）と 24 の低結合性ペプチド（全 234 ペプチドの 10%）がそれぞれ得られた。

続いて、これらの高結合性ペプチド、低結合性ペプチドの蛍光強度値を比較した（**Fig. 3-6B、3-6D**）。IL-2 においては、高結合性ペプチドでの平均蛍光強度値（2.23×10^6）が、低結合性ペプチドの平均蛍光強度値（1.22×10^6）よりも 1.8 倍高かった（**Table**

3-5)。しかし、中結合性ペプチドの平均蛍光強度値（2.44 x 10^6）と比較すると、ほとんど変わらなかった。IgG においては、高結合性ペプチドでの平均蛍光強度値（4.02 x 10^6）が、低結合性ペプチドの平均蛍光強度値（0.76 x 10^6）よりも 5.3 倍高かった（Table 3-6)。これによって、本手法は 4 残基ペプチドの結合性を元にして、8 残基ペプチドライブラリーから IL-2 及び IgG への高結合性・低結合性ペプチドを濃縮することに成功した。

3.3.4 新規 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ペプチドの解析

IL-2 受容体由来のペプチドでは、含まれる物理化学的性質が偏っている可能性があった。そこで、より広範囲の物理化学的性質を反映するため、4 group の物理化学的性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーから、新規 8 残基ペプチドライブラリーを作製した。4 残基ペプチドをランダムに 2 つを選出し、タンデムに繋げることで、8 残基ペプチドを作製した。上記同様に、新規 8 残基ペプチドライブラリー（全 640 ペプチド）から、IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数での主成分分析を用いて高結合性及び低結合性ペプチドを選出した（Fig. 3-7A、3-7C)。その結果、IL-2 では 128 の高結合性ペプチド（全 640 ペプチドの 20%）と 140 の低結合性ペプチド（全 640 ペプチドの 22%)、IgG では 103 の高結合性ペプチド（全 640 ペプチドの 16%）と 74 の低結合性ペプチド（全 640 ペプチドの 12%）がそれぞれ得られた。

続いて、これらの高結合性ペプチド、低結合性ペプチドの蛍光強度値を比較した（Fig. 3-7B、3-7D)。IL-2 においては、高結合性ペプチドでの平均蛍光強度値（0.89 x 10^5）が、低結合性ペプチドの平均蛍光強度値（0.27 x 10^5）よりも 3.3 倍高かった（Table 3-6)。IgG においては、高結合性ペプチドでの平均蛍光強度値（2.13 x 10^5）が、低結合性ペプチドの平均蛍光強度値（1.03 x 10^5）よりも 2.1 倍高かった（Table 3-6)。これによって、本手法は 4 残基ペプチドの結合性を元にして、新規 8 残基ペプチドライ

ブラリーから IL-2 及び IgG への高結合性・低結合性ペプチドを濃縮することに成功した。

3.4 考察

本章では、4 残基ペプチドライブラリー（全 512 ペプチド）の主成分分析を用いて、IL-2 及び IgG への結合に関わる物理化学的性質を解析した。そこで得られた結合性ルールを元に、更に IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドライブラリー（全 234 ペプチド）と、新規の 8 残基ペプチドライブラリー（全 640 ペプチド）の結合性を解析した。その結果、4 残基ペプチドライブラリーから得られた結合性を用いて、これらの 8 残基ライブラリーにおける高結合性及び低結合性ペプチドを濃縮できた。従って、本結果は短鎖ペプチドの結合の傾向から、より長鎖のペプチドの結合の傾向を予測できる可能性を示唆した。

IL-2 に対して高結合性あるいは低結合性であると定義した IL-2 受容体由来 8 残基ライブラリーのペプチドグループの蛍光強度値を **Table 3-5** に示しているが、高結合性グループの平均蛍光強度値は他のグループと同等であった。一方で、IgG に対して高結合性であった IL-2 受容体由来 8 残基ライブラリーのペプチドグループは、平均蛍光強度値が低結合性グループよりも大きく増加した。IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドライブラリーは、新規 8 残基ペプチドライブラリーと比べて、PCA プロットに占める領域が IL-2、IgG 共に小さかった（**Fig. 3-6A、3-7A**）。この原因としては、ヒト IL-2 受容体の細胞外ドメインにおけるアミノ酸残基が、物理化学的性質において偏っていることが考えられる。実際に、ヒト IL-2 受容体の細胞外ドメインでは、前章で定義したアミノ酸の group の出現率に偏りがあった（group 1 : 39.0%、group 2 : 38.7%、group 3 : 10.6%、group 4 : 11.7 %）。一方で新規 8 残基ペプチドライブラリーにおいては、各 group の出現率が group 1 で 40%、group 2 で 35%、group 3 で 15%、group 4 で 10 %であった。従って、新規 8 残基ペプチドライブラリーは group 2 を含むような疎

水的なペプチドの探索には適しているが、group 3 を含むような正電荷ペプチドの探索には適していないと思われる。

IgG 結合性ペプチドにおいては、新規 8 残基ペプチドライブラリー（**Fig. 3-7D**）よりも、IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリー（**Fig. 3-6D**）の方が、ペプチドを IgG 高結合性ペプチドと IgG 低結合性ペプチドに分類できていた。IL-2 高結合性グループと低結合性グループにおける平均蛍光強度の差を **Table 3-6** に示している。前章では、IL-2 高結合性ペプチドは group 4 に属するアミノ酸残基の出現頻度が大きく、group 3 のアミノ酸残基をほとんど含まないことを示した[29]。また、IgG 結合性ペプチドには group 3 のアミノ酸残基が含まれていることを示した。IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーには、IL-2 に高結合性を示すような多くのペプチドが存在するため、そこから得られた高結合性グループと低結合性グループ、その他のグループとの平均蛍光強度の差は相対的に小さいことが考えられる。IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーは、IL-2 の天然受容体である IL-2 受容体由来のアミノ酸配列で構成されているため、多くの IL-2 高結合性ペプチドの獲得が期待できる（**Fig. 3-6D**）。それに加えて、IgG に高結合性を持つ少数のペプチドが IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーに含まれていて、高結合性グループと低結合性グループの平均結合強度の差が相対的に大きいことも、またあり得る。実際、**Table 3-5** と **3-6** に示すように、IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーから得られた IgG 高結合グループと低結合グループの平均蛍光強度値の比は 5.3 倍と、新規 8 残基ペプチドライブラリーでの比である 2.1 倍より大きかった。従って、主成分プロットにおいてより広い領域を占めるようなペプチドライブラリーは、高／低結合性ペプチドの分類により適していると考えられる。しかし、本仮説を実証するためには、他のタンパク質ー受容体の組み合わせを用いた更なる検証が必要である。

新規 8 残基ライブラリーの平均蛍光強度は、IL-2 受容体由来 8 残基ライブラリーの平均蛍光強度と比べて IL-2、IgG 共に大きく減少している（**Table 3-5**、**3-6**）。これは

実験方法に示しているように、蛍光強度の測定に用いた機器が異なるためである。しかし、新規ライブラリーと IL-2 受容体由来のライブラリーで平均蛍光強度が異なっていたが、関連の比較は各ライブラリー内で行った。例えば、IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーにおいて、IL-2 高結合性グループの平均蛍光強度は低結合性グループよりも約 2 倍大きかったのに対し、新規 8 残基ペプチドライブラリーでは約 3.3 倍大きかったことは重視すべきである。

前章の 4 残基ペプチドライブラリーを用いた結合性解析において、IL-2 及び IgG に対するペプチドの結合性を解析した。その中で、IL-2 に対しては正電荷アミノ酸（group 3）を含まず、1 残基目に疎水性アミノ酸（group 1）または負電荷アミノ酸（group 4）、及び 2、4 残基目に group 1 のアミノ酸を含む高結合性ルールを得た。IgG に対しては、配列のいずれかに疎水性アミノ酸（group 2）と正電荷アミノ酸（group 3）を 1 か所含む高結合性ルールを得た[29]。これらのルールは、本章での結果と以下のように比較した。

主成分分析の変数においては、IL-2 の分析にあたって No.11 の変数を選択した。PC1 は 4 残基ペプチドの疎水性、極性、分配係数と相関したのに対し、PC2 は等電点、group 3 のアミノ酸残基の個数、group 4 のアミノ酸残基の個数と相関した。PC2 は group 3 のアミノ酸残基の個数と負に相関し、group 4 のアミノ酸残基の個数と正に相関していた。PC2 は IL-2 への結合性と正に相関していたため（**Fig. 3-1B**）、group 4 のアミノ酸残基の増加と共に結合性が増加した。従って、これらの結果は上記のような以前の結果を支持するものである。IgG においては、No.10 の変数による主成分分析を選択し、等電点に関連する変数の PC2 係数がやや負であった。PC2 は IgG への結合性と負に相関していたため（**Fig. 3-1D**）、group 3 のような正電荷アミノ酸残基を含むペプチドが高結合性ペプチドとして見つかっていた。一方で IL-2 においては、等電点に関連する変数の PC2 係数が特に負であった。PC2 は IL-2 への結合性と正に相関していたため（**Fig. 3-1B**）、group 4 のような負電荷アミノ酸残基を含むペプチドが高結合

性ペプチドとして見つかっていた。IgG では、疎水性指標に関連する変数の PC2 係数は、No.10 の変数を用いた主成分分析において正であった。PC2 は IgG への結合性と負の相関を示したため（**Fig. 3-1D**）、IgG への結合性はペプチドの疎水性が増加するにしたがって減少する。これらの結果はまた、当研究室が実施した以前の結果を支持するものでもある。

主成分分析の信頼性は累積寄与率が大きいほど増していき、0.8 以上の場合に採用することが一般的である。しかし、多くの研究者が 0.8 以下の累積寄与率で主成分分析を実施しており[36-38]、低い累積寄与率で構築された解析モデルでも信頼性があると考えられていることを示している。従って、累積寄与率が 0.8 未満であったが、本章では No.10 の変数と 11 での主成分分析を選択した。

更に、本章では 8 残基ペプチドの IL-2 や IgG への結合性ルールを 4 残基のペプチドから解析したが、これまでにカスパーゼや細胞接着、胆汁酸といった他の様々な分子への高結合性の物理化学的ルールも得ている[27, 28, 39]。従って、本手法を他の標的分子に適応することで、他の標的分子におけるより長鎖／短鎖のペプチドの結合性が解析できる可能性がある。

ペプチドの長さにおいては、構造が直鎖で結合データが計算での解析とよく一致するため、短鎖ペプチドに注目した。一般的に述べられているように、典型的なヘリックスは約 10 残基のアミノ酸を含んでいる。従って、本章では 8 残基のペプチドの結合特性を評価した。二次構造を自発的に形成してしまうため、10 残基以上の長鎖ペプチドからの探索に本章で提案した手法を応用することは困難である。一方で、本解析手法には特定の残基目の物理化学的指標（例：2 残基目の疎水度等）を必要としないため、本論文で実施した 4、8 残基以外のペプチドに適応できる可能性がある。

標的分子においては IL-2 と IgG を用いた。高結合性ペプチドの物理化学的性質は標的タンパク質の物理化学的性質を反映することが示唆されるものの、高結合性ペプチドの結合領域が、必ずしも標的タンパク質の結合サイトとは限らないと思われる。

この関係を理解するためには、IL-2 高結合性ペプチドが IL-2 と IL-2 受容体の結合を競合阻害できるかどうかを検証しなければならない。

本手法は、標的分子に対する高結合性または低結合性ペプチドが得られるため、結合に関与する物理化学的性質を理解する上で有用であろう。従って、私は本手法が結合性ペプチドの一次スクリーニングにおいて特に有用であると結論付けた。しかし、本手法で「高結合な性質である」と定義した性質を、標的分子に最高の結合性を持つペプチドが持っていない可能性も否定できないため、こうしたペプチドを本手法で探索可能かは不明瞭である。次の段階として、私は本手法を二次、三次スクリーニングに応用し、最高または最低の結合性を持つペプチドを探索することを計画している。そのためには、標的分子との結合に重要な変数と、ペプチドアレイを用いた結合強度を得た上で、網羅的かつ合理的な 8 残基ペプチドライブラリーを設計しなければならない。長鎖ペプチドでは配列の組み合わせが膨大になるために計算に時間がかかるが、主成分分析をした後であれば、新たに設計したペプチドから主成分スコアを算出することは容易である。

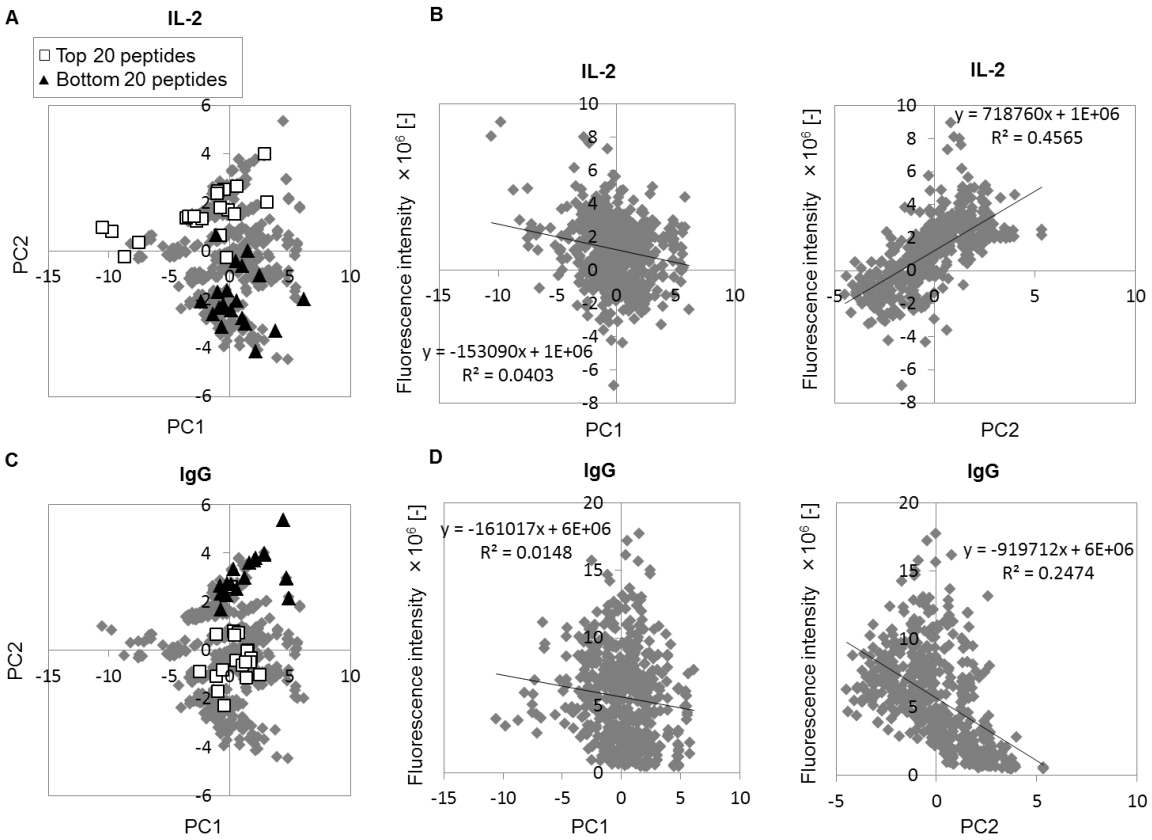


Fig. 3-1　タンパク質間相互作用に重要な 4 性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーにおける 16 変数（PCA11）を用いた主成分分析

16 変数を用いた 4 残基ペプチドライブラリーの主成分プロット（**Fig. 3-1A** : IL-2、**Fig. 3-1C** : IgG）。1 点が 1 ペプチドの主成分スコアを表している。図中の白い四角は、標的タンパク質に対して高結合な上位 20 ペプチド、黒い三角は標的タンパク質に対して低結合な下位 20 ペプチド、灰色の菱形はその間のペプチドをそれぞれ表している。**Fig. 3-1B** と **Fig. 3-1D** は、4 残基ペプチドライブラリーにおける、各標的タンパク質（IL-2、IgG）に対する蛍光強度値と、主成分スコア（PC1、PC2）との相関図を表している。PC1 及び PC2 は、16 変数を用いて **Fig. 3-1A** または **Fig. 3-1C** から抽出した。図中の実線及び数式は、一次近似直線及び近似式を表している。

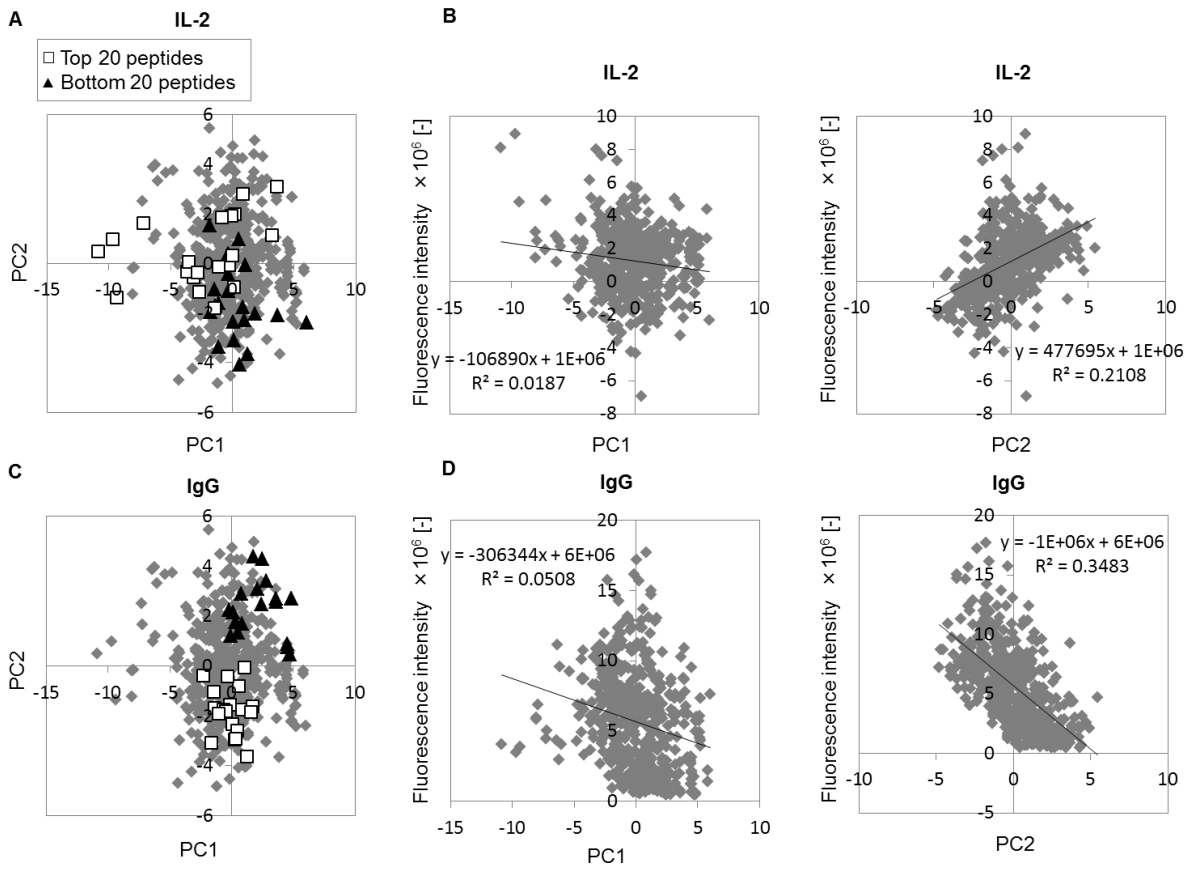


Fig. 3-2　タンパク質間相互作用に重要な 4 性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーにおける 18 変数を用いた主成分分析

18 変数を用いた 4 残基ペプチドライブラリーの主成分プロット（**Fig. 3-2A**：IL-2、**Fig. 3-2C**：IgG）。1 点が 1 ペプチドの主成分スコアを表している。図中の白い四角は、標的タンパク質に対して高結合な上位 20 ペプチド、黒い三角は標的タンパク質に対して低結合な下位 20 ペプチド、灰色の菱形はその間のペプチドをそれぞれ表している。**Fig. 3-2B** と **Fig. 3-2D** は、4 残基ペプチドライブラリーにおける、各標的タンパク質（IL-2、IgG）に対する蛍光強度値と、主成分スコア（PC1、PC2）との相関図を表している。PC1 及び PC2 は、18 変数を用いて **Fig. 3-2A** または **Fig. 3-2C** から抽出した。図中の実線及び数式は、一次近似直線及び近似式を表している。

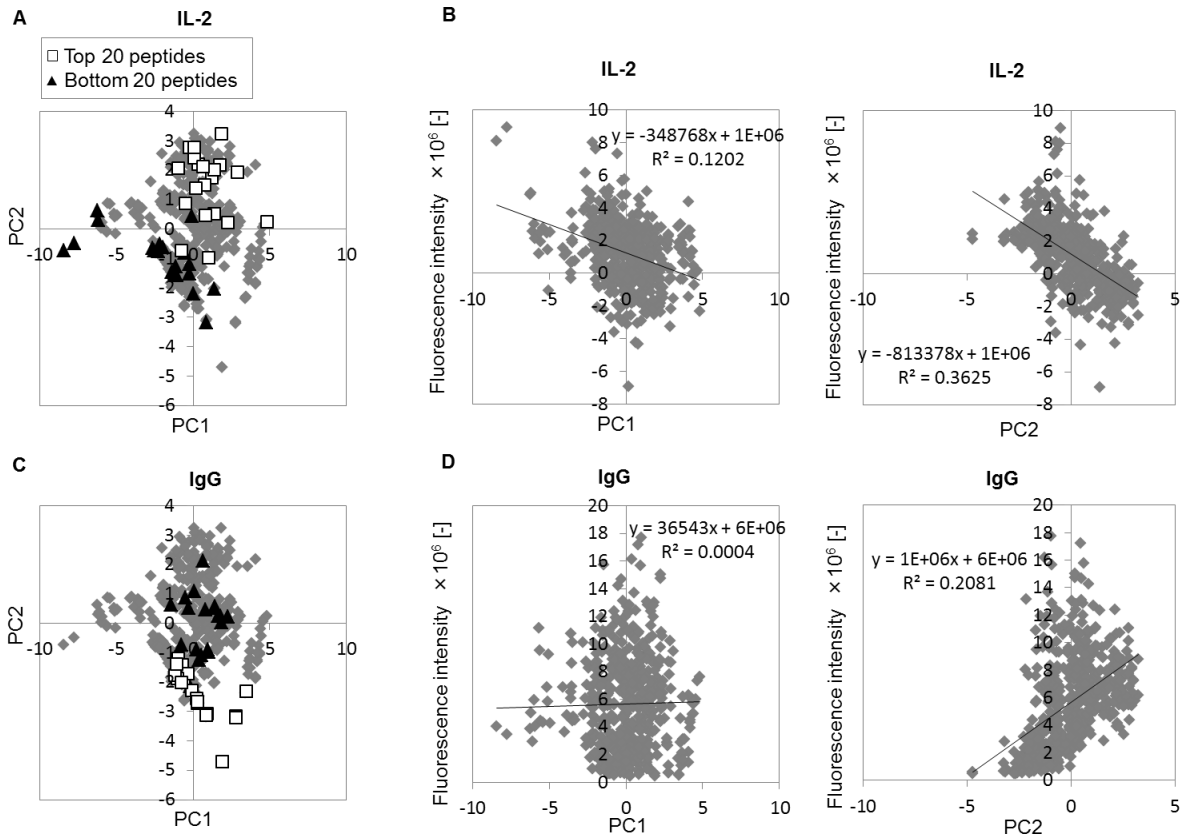


Fig. 3-3　タンパク質間相互作用に重要な 4 性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーにおける 9 変数を用いた主成分分析

9 変数を用いた 4 残基ペプチドライブラリーの主成分プロット（**Fig. 3-3A**：IL-2、**Fig. 3-3C**：IgG）。1 点が 1 ペプチドの主成分スコアを表している。図中の白い四角は、標的タンパク質に対して高結合な上位 20 ペプチド、黒い三角は標的タンパク質に対して低結合な下位 20 ペプチド、灰色の菱形はその間のペプチドをそれぞれ表している。**Fig. 3-3B** と **Fig. 3-3D** は、4 残基ペプチドライブラリーにおける、各標的タンパク質（IL-2、IgG）に対する蛍光強度値と、主成分スコア（PC1、PC2）との相関図を表している。PC1 及び PC2 は、9 変数を用いて **Fig. 3-3A** または **Fig. 3-3C** から抽出した。図中の実線及び数式は、一次近似直線及び近似式を表している。

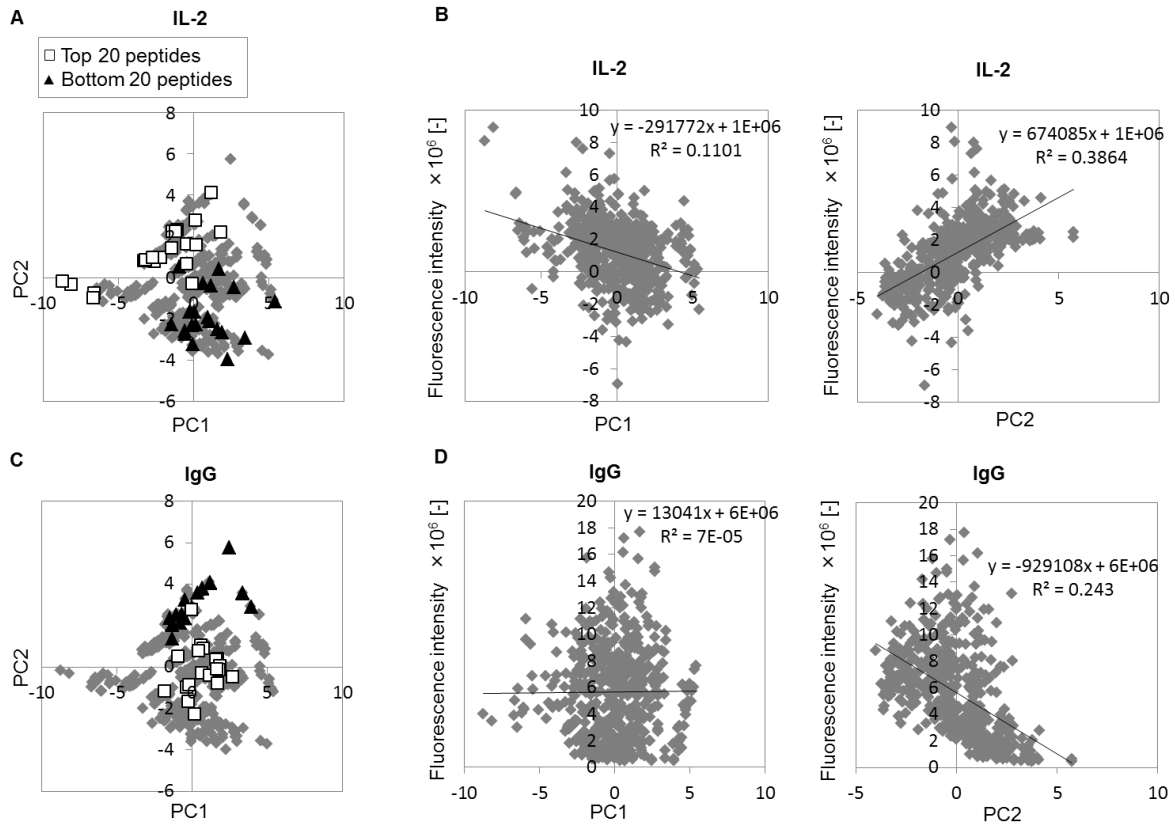


Fig. 3-4　タンパク質間相互作用に重要な 4 性質を網羅した 4 残基ペプチドライブラリーにおける 13 変数を用いた主成分分析

13 変数を用いた 4 残基ペプチドライブラリーの主成分プロット（**Fig. 3-4A** : IL-2、**Fig. 3-4C** : IgG）。1 点が 1 ペプチドの主成分スコアを表している。図中の白い四角は、標的タンパク質に対して高結合な上位 20 ペプチド、黒い三角は標的タンパク質に対して低結合な下位 20 ペプチド、灰色の菱形はその間のペプチドをそれぞれ表している。**Fig. 3-4B** と **Fig. 3-4D** は、4 残基ペプチドライブラリーにおける、各標的タンパク質（IL-2、IgG）に対する蛍光強度値と、主成分スコア（PC1、PC2）との相関図を表している。PC1 及び PC2 は、13 変数を用いて **Fig. 3-4A** または **Fig. 3-4C** から抽出した。図中の実線及び数式は、一次近似直線及び近似式を表している。

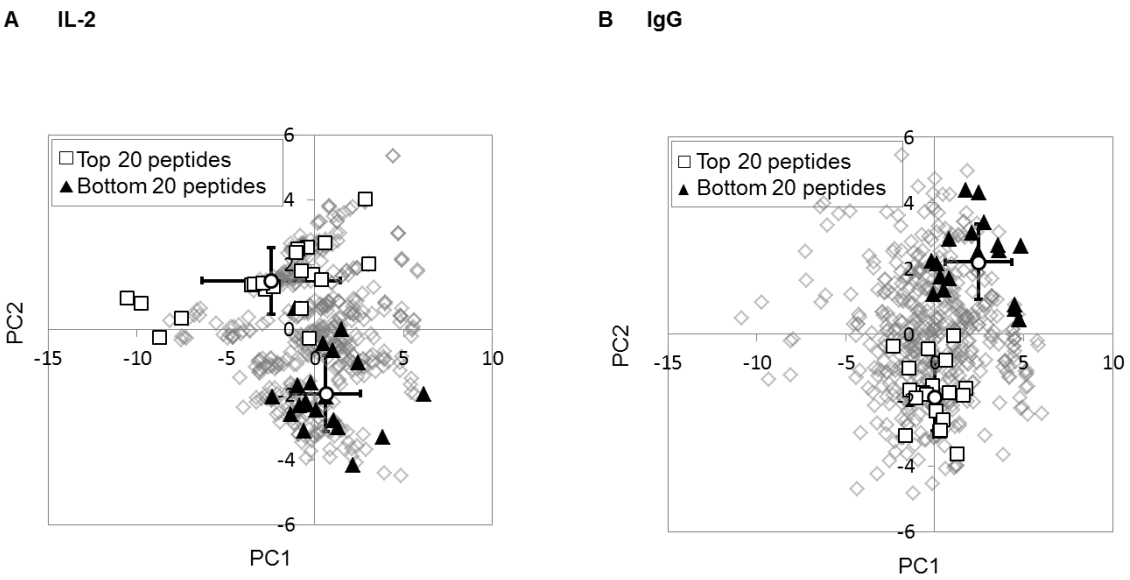


Fig. 3-5　4 残基ペプチドライブラリーでの主成分プロットを用いた高結合性及び低結合性ルール

図中の白い四角及び線は、標的タンパク質に対して高結合な上位 20 ペプチドの主成分スコアの平均値及び標準偏差を表している。黒い三角及び線は、標的タンパク質に対して低結合な下位 20 ペプチドの主成分スコアの平均値及び標準偏差を表している。これらは、IL-2 においては 16 変数（**Fig. 3-1**）、IgG においては 18 変数（**Fig. 3-2**）を用いた主成分分析から算出した。(A)は IL-2、(B)は IgG における主成分プロットを表す。

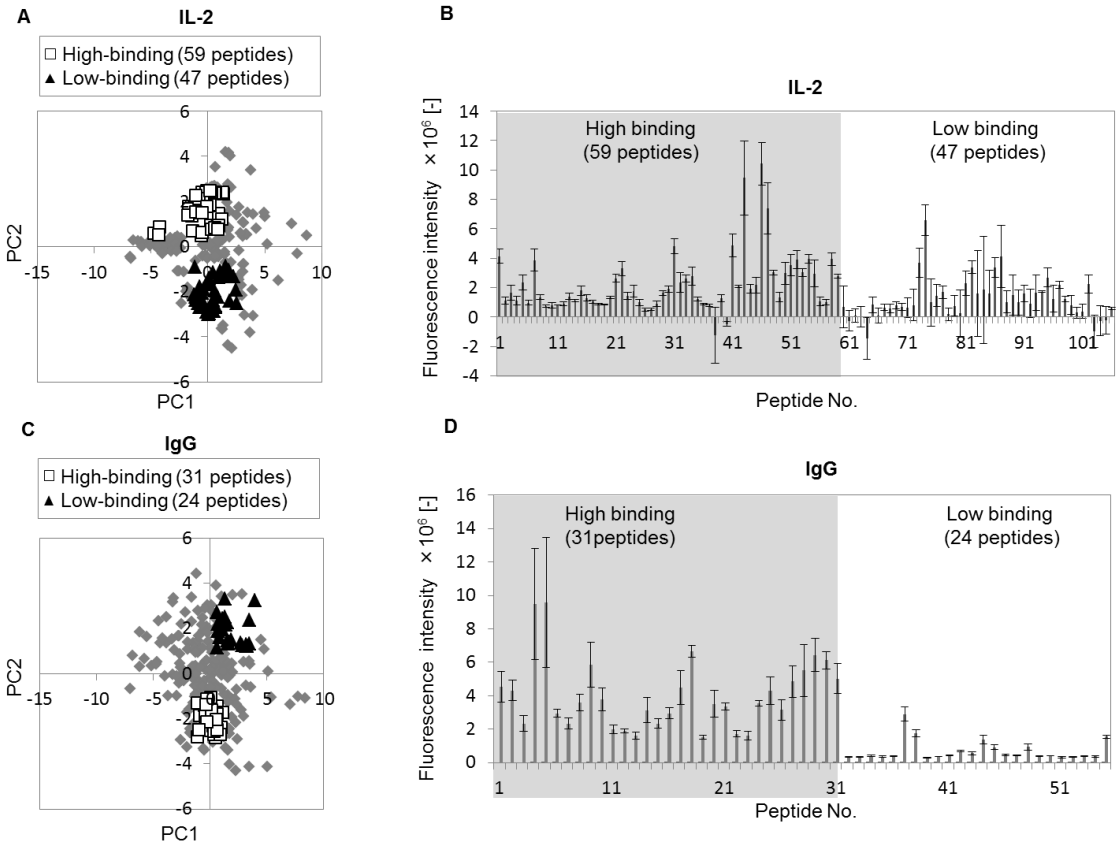


Fig. 3-6　IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ルールの構築

IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドの主成分スコア（**Fig. 3-6A**、**3-6C**）と、高結合性及び低結合性ペプチドの蛍光強度（**Fig. 3-6B**、**3-6D**）を示す。高結合性及び低結合性ルールは、4 残基ペプチドライブラリーにおける主成分スコアから、IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数を用いて、**Fig. 3-5** と同様に構築した。また、IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドにおける主成分スコアも、同様に IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数を用いてそれぞれ算出した。次いで、4 残基ペプチドで構築した高結合性及び低結合性ルールに当てはまる IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドを全て選択し、IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドにおける高結合性ペプチド及び低結合性ペプチドと定義した。**Fig. 3-6A** は IL-2、**Fig. 3-6C** は IgG における主成分プロットである。図中の白い四角は高結合性ペプチド、黒い三角は低結合性ペプチドを表している。高結合性ペプチドは、IL-2 で 59 種、IgG で 31 種あり、低結合性ペプチドは IL-2 で 47 種、IgG で 24 種あった。

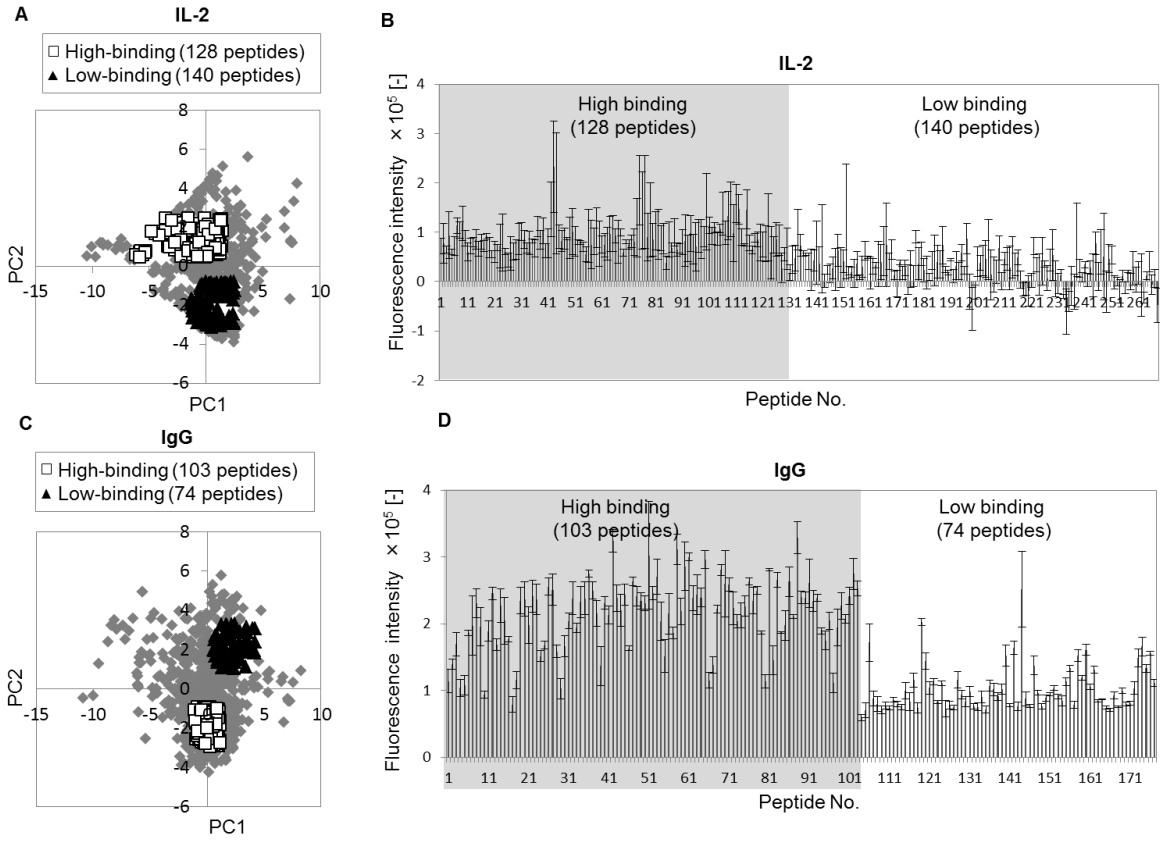


Fig. 3-7　新規 8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性及び低結合性ルールの構築

新規 8 残基ペプチドの主成分スコア（**Fig. 3-6A**、**3-6C**）と、高結合性及び低結合性ペプチドの蛍光強度（**Fig. 3-6B**、**3-6D**）を示す。高結合性及び低結合性ルールは、4 残基ペプチドライブラリーにおける主成分スコアから、IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数を用いて、**Fig. 3-5** と同様に構築した。また、新規 8 残基ペプチドにおける主成分スコアも、同様に IL-2 では 16 変数、IgG では 18 変数を用いてそれぞれ算出した。次いで、4 残基ペプチドで構築した高結合性及び低結合性ルールに当てはまる新規 8 残基ペプチドを全て選択し、新規 8 残基ペプチドにおける高結合性ペプチド及び低結合性ペプチドと定義した。**Fig. 3-6A** は IL-2、**Fig. 3-6C** は IgG における主成分プロットである。図中の白い四角は高結合性ペプチド、黒い三角は低結合性ペプチドを表している。高結合性ペプチドは、IL-2 で 59 種、IgG で 31 種あり、低結合性ペプチドは IL-2 で 47 種、IgG で 24 種あった。

Table 3-1　4 残基ペプチドの一覧（512 ペプチド）

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
1	IVFF	31	VSDK	61	MDEI	91	QWKR	121	SDKA
2	VILW	32	FQEE	62	AEEW	92	YNHE	122	SDRW
3	GCVH	33	CHFG	63	CEDR	93	YPEG	123	QERK
4	IMIE	34	MHLP	64	CDDD	94	WSDN	124	WEHD
5	IFWC	35	AKVR	65	PGIL	95	NNER	125	TEEF
6	MVSQ	36	VRID	66	QFVS	96	NPDE	126	PEDS
7	VIPR	37	FHNC	67	WFFH	97	SKFM	127	PDEH
8	VCQE	38	FKPP	68	QMLE	98	WHVQ	128	NDDD
9	GGHL	39	LHQH	69	PVPF	99	NRLR	129	KGIM
10	IGKQ	40	LKWE	70	TCNT	100	THID	130	HFFN
11	LARH	41	IKHL	71	YAQR	101	PKTG	131	RVLR
12	VFKD	42	GKHS	72	TLYD	102	PRNY	132	RVVE
13	FLDV	43	ARRR	73	QMHM	103	YKQK	133	HFNL
14	FLEY	44	FHKE	74	SART	104	QRYD	134	HMYW
15	FMDH	45	LREM	75	QCRR	105	QKKF	135	RISR
16	CAEE	46	LRDT	76	NLKD	106	WHKT	136	RCTD
17	LPAV	47	IRDR	77	YVEV	107	NRHR	137	HMKF
18	AWCN	48	MHEE	78	YGDP	108	SRRE	138	HLHN
19	ASMK	49	ADMV	79	WIDK	109	YKEG	139	KCRK
20	CTGD	50	CEAW	80	WIEE	110	THDP	140	KAHE
21	VTTV	51	MDGH	81	TQAA	111	YHEH	141	HGEM
22	LPYN	52	GECE	82	SWGQ	112	PKDD	142	KAEY
23	CTNH	53	VEWV	83	WYCK	113	TECG	143	RIDH
24	ISSD	54	FEST	84	SSMD	114	PEMQ	144	HLDD
25	GYHI	55	GDYR	85	STPV	115	QEAR	145	HYAA
26	ANRP	56	IDTD	86	NQWS	116	SDGD	146	KWGT
27	CYRK	57	MEKF	87	PPSK	117	WESI	147	HNMK
28	MNKE	58	MDKS	88	TYTD	118	NDPP	148	RNCE
29	GQEC	59	GDHR	89	YTRM	119	TDQR	149	HTQL
30	LWDQ	60	AERE	90	YWHQ	120	NDWE	150	HQPY

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
151	HSWH	181	RENC	211	EWMK	241	EDAC	271	VFER
152	KQND	182	RDYS	212	ENAD	242	EEMN	272	ALDD
153	RYKA	183	HEPK	213	EWTI	243	DDGH	273	CYGA
154	RPRS	184	HEQD	214	EYYY	244	DDCD	274	MQAW
155	KTHK	185	REHG	215	DYQH	245	EETI	275	LSCH
156	RPKE	186	REHW	216	DSNE	246	EESQ	276	ATME
157	HNDG	187	KDRH	217	DNKL	247	DDNK	277	IWSC
158	KWES	188	RDKD	218	EQRS	248	EEYE	278	LNNP
159	KQDH	189	REDC	219	DQRR	249	EDKI	279	GPYR
160	HSED	190	REEP	220	ESHD	250	EEKW	280	FSTD
161	KRFV	191	KDEK	221	ETDL	251	EERH	281	GPRM
162	RRVT	192	KDDE	222	DPDW	252	EDHD	282	VYKY
163	KKIK	193	EGIC	223	ETEK	253	EDDA	283	GQHK
164	RRLE	194	EILN	224	DYEE	254	DEEN	284	LTRD
165	KHSF	195	EMVH	225	DKIM	255	EEDR	285	MSDA
166	HKYY	196	DCFD	226	DHVP	256	DDEE	286	VWES
167	RHTH	197	DLPI	227	DHFR	257	MVLF	287	LTER
168	HHWE	198	EAWY	228	DKLD	258	ILFS	288	MNDE
169	HHRL	199	DCTK	229	EKQI	259	CVVR	289	IHIL
170	HKRY	200	EISE	230	DRPW	260	FIID	290	CHLW
171	KKKH	201	DGHF	231	EHWK	261	GCQG	291	FRVK
172	KHHD	202	DFKQ	232	DKSE	262	FMPQ	292	AKFD
173	KRDG	203	DVRH	233	DHHA	263	IMSK	293	GRQF
174	HKDY	204	DMKE	234	ERHP	264	CAWE	294	LRPP
175	KREK	205	DFEM	235	EKRR	265	VFRC	295	CRNR
176	KRED	206	EVDW	236	ERKE	266	MCKY	296	VHWE
177	RDGC	207	EADR	237	DRDA	267	AGKH	297	CRHI
178	REAN	208	DLED	238	DHDT	268	MAHE	298	FHHQ
179	RDCH	209	DTCA	239	EHEK	269	MIDC	299	FKKK
180	KDME	210	DPGT	240	DRED	270	GGEP	300	VKRE

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
301	IKEM	331	YVRR	361	THKF	391	HVTH	421	RRTM
302	VHEY	332	YGRE	362	SRHW	392	RIYD	422	KHWN
303	AKDR	333	NMEC	363	PKRK	393	KMKA	423	KKYR
304	GHDD	334	WFDT	364	PKKD	394	KVRS	424	RHSE
305	FEGL	335	TMER	365	WKEL	395	HGHK	425	HRRC
306	IECN	336	YGDE	366	PKDS	396	HFHE	426	KRKS
307	ADAH	337	WSCV	367	QRDH	397	HLEI	427	HRHK
308	AEME	338	QTGN	368	NHED	398	HAEN	428	RRRE
309	LDYI	339	SPAH	369	YEAI	399	RADH	429	HHDF
310	IETW	340	QWMD	370	QDMT	400	HCDD	430	HRDW
311	LESK	341	NYPL	371	WDGK	401	HTAA	431	RKEH
312	FDWE	342	WNWW	372	YDCD	402	KNMP	432	KKED
313	ADKG	343	WNTK	373	YDPL	403	KTGR	433	REMG
314	LDKT	344	SYSD	374	SDQS	404	RWCD	434	HEAN
315	GDHR	345	SSHA	375	PESK	405	RSWF	435	RDCK
316	VERE	346	QTKT	376	QEWE	406	HQQQ	436	REGD
317	CEDC	347	WPRR	377	NEKI	407	RYPK	437	HDYF
318	IDDP	348	TWHE	378	PERT	408	RYNE	438	RDQW
319	MEEH	349	SQDV	379	TDHR	409	KWHV	439	RENH
320	CDED	350	PPEQ	380	QDRD	410	KQKY	440	KDPE
321	SLVA	351	NWDH	381	NEDV	411	HPRH	441	KEKG
322	PLFY	352	YQED	382	TDDY	412	RSKD	442	RDHS
323	WAIR	353	TKFI	383	PEEK	413	HNEF	443	KEHK
324	SALE	354	TRIW	384	YEEE	414	KPDQ	444	HDRD
325	QINC	355	WRLR	385	KIIV	415	RNDK	445	RDEV
326	PVYN	356	NKVE	386	RMFT	416	RQEE	446	HEDW
327	SFPH	357	THNL	387	HGVR	417	KHFG	447	KEDH
328	NCQE	358	YRQQ	388	HFLD	418	KKVS	448	KDEE
329	YIHG	359	QHTK	389	HCNV	419	RKLH	449	EFLG
330	NCKP	360	THYE	390	KLSP	420	KHID	450	DCIQ

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
451	DGVR	481	DRIM	511	DEDH
452	DMFD	482	ERFN	512	EEDD
453	DISM	483	DRLH		
454	EFTT	484	EKVE		
455	EAWH	485	EHSG		
456	EMPE	486	DHPY		
457	EGHL	487	DHWR		
458	EVKQ	488	DRQD		
459	DAKK	489	DKHM		
460	EIRD	490	EKRW		
461	DCDA	491	EHHK		
462	DLEY	492	EKKE		
463	DVDR	493	EKDM		
464	DLEE	494	DHEN		
465	EWAI	495	ERDH		
466	EQMQ	496	EHED		
467	DTCH	497	DEMC		
468	ESGE	498	DECT		
469	ETTA	499	EDAR		
470	EYQP	500	DEGD		
471	EPNR	501	EDTF		
472	DWYD	502	DDYP		
473	DPKM	503	EDSH		
474	DYHY	504	DEND		
475	DNRK	505	EERI		
476	DQRE	506	EDHN		
477	DYDL	507	DEKK		
478	DNDT	508	EDKE		
479	ESER	509	EDEV		
480	ETED	510	DDES		

Table 3-2　IL-2 受容体由来 8 残基ペプチドの一覧（234 ペプチド）

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
1	MDSYLLMW	31	GSLYMLCT	61	LPGHCREP	91	QLICTGEM
2	SYLLMWGL	32	LYMLCTGN	62	GHCREPPP	92	ICTGEMET
3	LLMWGLLT	33	MLCTGNSS	63	CREPPPWE	93	TGEMETSQ
4	MWGLLTFI	34	CTGNSSHS	64	EPPPWENE	94	EMETSQFP
5	GLLTFIMV	35	GNSSHSSW	65	PPWENEAT	95	ETSQFPGE
6	LTFIMVPG	36	SSHSSWDN	66	WENEATER	96	SQFPGEEK
7	FIMVPGCQ	37	HSSWDNQC	67	NEATERIY	97	FPGEEKPQ
8	MVPGCQAE	38	SWDNQCQC	68	ATERIYHF	98	GEEKPQAS
9	PGCQAELC	39	DNQCQCTS	69	ERIYHFVV	99	EKPQASPE
10	CQAELCDD	40	QCQCTSSA	70	IYHFVVGQ	100	PQASPEGR
11	AELCDDDP	41	QCTSSATR	71	HFVVGQMV	101	ASPEGRPE
12	LCDDDPPE	42	TSSATRNT	72	VVGQMVYY	102	PEGRPESE
13	DDDPPEIP	43	SATRNTTK	73	GQMVYYQC	103	GRPESETS
14	DPPEIPHA	44	TRNTTKQV	74	MVYYQCVQ	104	PESETSCL
15	PEIPHATF	45	NTTKQVTP	75	YYQCVQGY	105	SETSCLVT
16	IPHATFKA	46	TKQVTPQP	76	QCVQGYRA	106	TSCLVTTT
17	HATFKAMA	47	QVTPQPEE	77	VQGYRALH	107	CLVTTTDF
18	TFKAMAYK	48	TPQPEEQK	78	GYRALHRG	108	VTTTDFQI
19	KAMAYKEG	49	QPEEQKER	79	RALHRGPA	109	TTDFQIQT
20	MAYKEGTM	50	EEQKERKT	80	LHRGPAES	110	DFQIQTEM
21	YKEGTMLN	51	QKERKTTE	81	RGPAESVC	111	QIQTEMAA
22	EGTMLNCE	52	ERKTTEMQ	82	PAESVCKM	112	QTEMAATM
23	TMLNCECK	53	KTTEMQSP	83	ESVCKMTH	113	EMAATMET
24	LNCECKRG	54	TEMQSPMQ	84	VCKMTHGK	114	AATMETSI
25	CECKRGFR	55	MQSPMQPV	85	KMTHGKTR	115	TMETSIFT
26	CKRGFRRI	56	SPMQPVDQ	86	THGKTRWT	116	ETSIFTTE
27	RGFRRIKS	57	MQPVDQAS	87	GKTRWTQP	117	SIFTTEYQ
28	FRRIKSGS	58	PVDQASLP	88	TRWTQPQL	118	MAAPALSW
29	RIKSGSLY	59	DQASLPGH	89	WTQPQLIC	119	APALSWRL
30	KSGSLYML	60	ASLPGHCR	90	QPQLICTG	120	ALSWRLPL

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
121	SWRLPLLI	151	RRRWNQTC	181	FENLRLMA	211	KQKQEWIC
122	RLPLLILL	152	RWNQTCEL	182	NLRLMAPI	212	KQEWICLE
123	PLLILLLP	153	NQTCELLP	183	RLMAPISL	213	EWICLETL
124	LILLLPLA	154	TCELLPVS	184	MAPISLQV	214	ICLETLTP
125	LLLPLATS	155	ELLPVSQA	185	PISLQVVH	215	LETLTPDT
126	LPLATSWA	156	LPVSQASW	186	SLQVVHVE	216	TLTPDTQY
127	LATSWASA	157	VSQASWAC	187	QVVHVETH	217	TPDTQYEF
128	TSWASAAV	158	QASWACNL	188	VHVETHRC	218	DTQYEFQV
129	WASAAVNG	159	SWACNLIL	189	VETHRCNI	219	QYEFQVRV
130	SAAVNGTS	160	ACNLILGA	190	THRCNISW	220	EFQVRVKP
131	AVNGTSQF	161	NLILGAPD	191	RCNISWEI	221	QVRVKPLQ
132	NGTSQFTC	162	ILGAPDSQ	192	NISWEISQ	222	RVKPLQGE
133	TSQFTCFY	163	GAPDSQKL	193	SWEISQAS	223	KPLQGEFT
134	QFTCFYNS	164	PDSQKLTT	194	EISQASHY	224	LQGEFTTW
135	TCFYNSRA	165	SQKLTTVD	195	SQASHYFE	225	GEFTTWSP
136	FYNSRANI	166	KLTTVDIV	196	ASHYFERH	226	FTTWSPWS
137	NSRANISC	167	TTVDIVTL	197	HYFERHLE	227	TWSPWSQP
138	RANISCVW	168	VDIVTLRV	198	FERHLEFE	228	SPWSQPLA
139	NISCVWSQ	169	IVTLRVLC	199	RHLEFEAR	229	WSQPLAFR
140	SCVWSQDG	170	TLRVLCRE	200	LEFEARTL	230	QPLAFRTK
141	VWSQDGAL	171	RVLCREGV	201	FEARTLSP	231	LAFRTKPA
142	SQDGALQD	172	LCREGVRW	202	ARTLSPGH	232	FRTKPAAL
143	DGALQDTS	173	REGVRWRV	203	TLSPGHTW	233	TKPAALGK
144	ALQDTSCQ	174	GVRWRVMA	204	SPGHTWEE	234	PAALGKDT
145	QDTSCQVH	175	RWRVMAIQ	205	GHTWEEAP		
146	TSCQVHAW	176	RVMAIQDF	206	TWEEAPLL		
147	CQVHAWPD	177	MAIQDFKP	207	EEAPLLTL		
148	VHAWPDRR	178	IQDFKPFE	208	APLLTLKQ		
149	AWPDRRRW	179	DFKPFENL	209	LLTLKQKQ		
150	PDRRRWNQ	180	KPFENLRL	210	TLKQKQEW		

Table 3-3　新規 8 残基ペプチドの一覧（640 ペプチド）

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
1	DDESHCDD	31	DFEMWSCV	61	GGEPIKEM	91	SLVAIVFF
2	EEMNGGEP	32	SSHASWGQ	62	HCDDYWHQ	92	LKWETHNL
3	WSCVLPAV	33	CYGARWCD	63	LKWEESGE	93	HYAADMFD
4	CHLWSWGQ	34	FMPQIGKQ	64	AEMENCKP	94	HMKFKLSP
5	PVPFSTPV	35	ILFSRPRS	65	PKDSLPAV	95	DYHYGDYR
6	VTTVSTPV	36	VEWVASMK	66	RSKDPGIL	96	CDEDPKDS
7	PVPFWFFH	37	YEAIMCKY	67	ILFSRNCE	97	SLVAMAHE
8	MVSQWSCV	38	KMKASPAH	68	PGILMNKE	98	PGILETTA
9	FMPQPVPF	39	VIPRTHNL	69	LESKPKKD	99	LNNPTECG
10	FMPQIFWC	40	PKRKFIID	70	VTTVQMLE	100	VTTVYQED
11	IVFFILFS	41	ESHDHSED	71	MQAWCAWE	101	NMECKLSP
12	SALESALE	42	SWGQMVLF	72	VILWSSHA	102	TECGCRNR
13	GGEPRIDH	43	CYGAIVFF	73	AEEWIHIL	103	ASMKGGEP
14	MVSQMDKS	44	STPVIHIL	74	GCQGIHIL	104	TDHRAWCN
15	CHLWEYQP	45	CYGAVILW	75	YVEVVILW	105	EHEKPLFY
16	YEEETEEF	46	WSCVCYGA	76	TWHEVILW	106	PESKSTPV
17	FKKKEYQP	47	MVLFIFWC	77	MVSQKHSF	107	CYGADRED
18	KNMPEDHN	48	AWCNWSCV	78	SARTSLVA	108	TQAAEERI
19	SDGDARRR	49	THKFSART	79	RRTMILFS	109	SWGQGGHL
20	DDNKPVPF	50	NHEDREMG	80	EAWHKQKY	110	IHILFMDH
21	KAHEPVPF	51	CEDCYKEG	81	DDYPHGEM	111	ILFSEMVH
22	QRDHMVSQ	52	ESGERPKE	82	STPVVTTV	112	QFVSEILN
23	REMGWKEL	53	WSCVCEDC	83	MVSQMVSQ	113	TQAAFMPQ
24	SLVALSCH	54	LPAVHLDD	84	VILWVILW	114	PVPFPPSK
25	PLFYEFLG	55	MQAWDDYP	85	IFWCNYPL	115	KGIMWFFH
26	VILWEISE	56	QINCMSDA	86	WNWWLPAV	116	IWSCRISR
27	LWDQWNWW	57	IFWCSDGD	87	LPAVQINC	117	TQAAHHRL
28	FLEYNYPL	58	AWCNQDMT	88	SLVAPVPF	118	IGKQQWMD
29	EVDWMQAW	59	IWSCWEHD	89	ILFSLPYN	119	PKTGDCIQ
30	IMIEMVSQ	60	EDACHQPY	90	QINCWNWW	120	RISRFDWE

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
121	LDKTKDME	151	FIIDVILW	181	EERHKKYR	211	EDDASRHW
122	DEMCGQEC	152	DYDLLNNP	182	EKRWRRVT	212	KQKYDYHY
123	PVYNAWCN	153	HDYFPLFY	183	PKRKRRRE	213	KVRSDHVP
124	IVFFPLFY	154	IDTDAWCN	184	QWKREERH	214	HEDWWPRR
125	WNWWPLFY	155	ILFSFKPP	185	KKYRRPKE	215	DRDAIWSC
126	LPYNSLVA	156	KTGRMQAW	186	RVLRGQHK	216	DRPWEDTF
127	NYPLMVLF	157	YVRRLPAV	187	WRLRHRHK	217	PERTEMVH
128	LNNPSLVA	158	MEKFIMSK	188	KKYRQRDH	218	WDGKRRLE
129	IFWCMQAW	159	FEGLRYKA	189	RYKAWNWW	219	DRQDHKYY
130	ILFSFMPQ	160	ARRRVIPR	190	EWMKWAIR	220	QRYDWNTK
131	ASMKSKFM	161	EEDRHRDW	191	HHDFKKYR	221	FRVKAKDR
132	SLVADYQH	162	HPRHRHTH	192	YRQQHDYF	222	HHRLKHHD
133	ENADCHFG	163	HDRDKDEK	193	KTGREVDW	223	GPRMRRLE
134	DLEDTQAA	164	KKYRKKYR	194	YRQQDMFD	224	DQRRPKRK
135	EEYEWSDN	165	QWKRYVRR	195	RRVTHLHN	225	KHIDWPRR
136	IMIENEDV	166	ARRRWPRR	196	KHFGYVRR	226	ETEKRVLR
137	FHNCEHED	167	WPRRYVRR	197	KKIKKCRK	227	QWKRKEHK
138	DLEYDHHA	168	RYKAPRNY	198	WPRRRKLH	228	PRNYKAHE
139	HGVRMSDA	169	NHEDREHW	199	KCRKSRHW	229	WRLRKDEK
140	EDARWSCV	170	AEEWCAEE	200	QWKRLRPP	230	PKRKHRDW
141	VILWSDRW	171	DTCHHHRL	201	HRDWDEKK	231	WRLREHEK
142	ETDLCEDR	172	QWKRDDEE	202	PEEKEKRW	232	KKYREEDR
143	PLFYYWHQ	173	HKDYWFFH	203	KDRHDRED	233	CHLWQWKR
144	CYGAHVTH	174	KREDVILW	204	WKELCTNH	234	RPRSQFVS
145	MVLFDYDL	175	CHLWDQRE	205	RWCDSRHW	235	LREMGGHL
146	LPAVVEWV	176	LPAVTDHR	206	ARRRRRVT	236	TRIWALDD
147	LPAVDLEY	177	DQRRKIIV	207	WPRRNRLR	237	WKELKKYR
148	IETWIHIL	178	VYKYPESK	208	WPRRPKRK	238	RRTMIECN
149	HFFNWHVQ	179	EERIKKYR	209	QWKRKKYR	239	YVRRHMKF
150	DFKQSLVA	180	ERKEWRLR	210	EEDDFDWE	240	YRQQEEKW

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
241	EERHKEDH	271	DHWRYRQQ	301	ERHPWPRR	331	WPRRDHDT
242	WRLRNRLR	272	KCRKNRHR	302	RNDKYRQQ	332	VILWKDDE
243	QWKRWPRR	273	QWKRKEDH	303	KDRHRYPK	333	KQDHAEEW
244	KKYRRYKA	274	WRLRKRED	304	EIRDNRLR	334	EYYYTDQR
245	PKRKARRR	275	NYPLRYPK	305	RKEHQWKR	335	RQEEFRVK
246	KCRKRYPK	276	LKWERYPK	306	KQDHRISR	336	KWGTEPNR
247	HHWEETED	277	RRVTTQAA	307	WRLRQRYD	337	HEPKQWKR
248	HSWHNCQE	278	KWESWPRR	308	WPRRPKDD	338	RRVTERDH
249	ADKGKRFV	279	RRTMKWHV	309	PKRKHRRC	339	KCRKKREK
250	DYHYRPRS	280	KKYREHWK	310	RPRSRDKD	340	WPRRDRPW
251	KKYREDSH	281	DKHMREHW	311	RYPKNQWS	341	WHVQTWHE
252	KRDGIWSC	282	REHWEHHK	312	PKRKAWCN	342	FHKELNNP
253	WNWWRDKD	283	RIDHEDKE	313	PKRKCHLW	343	WFFHKVRS
254	LPAVRNDK	284	KKKHKDRH	314	QMHMRRVT	344	MQAWHHRL
255	LPYNKRED	285	EHWKKKIK	315	MHLPPRNY	345	WHVQKKYR
256	HKRYTHID	286	WRLRPKRK	316	YWHQYRQQ	346	LPYNWRLR
257	RKEHFLDV	287	ARRRRPRS	317	EYYYQWKR	347	IETWFKKK
258	RDCKHSWH	288	RRTMWRLR	318	QWKRWKEL	348	EWAIQKKF
259	TDHRKHWN	289	HLDDKDRH	319	ARRRIGKQ	349	LARHHHDF
260	PERTHMKF	290	DEDHEDTF	320	WRLRHHRL	350	KWHVFHNC
261	VFRCQERK	291	LSCHDNKL	321	FKKKWAIR	351	VFEREWAI
262	CRHIREMG	292	HLDDRWCD	322	PKRKRYPK	352	TWHEWRLR
263	RQEEWRLR	293	NRLRLDKT	323	MAHEDHFR	353	DWYDKKYR
264	HRHKYRQQ	294	DFKQEKRR	324	MNDERIYD	354	TKFIQWKR
265	NKVEWPRR	295	HRDWQTKT	325	NMECNRHR	355	THKFWPRR
266	NRHRQWKR	296	DQREEHWK	326	FHKEYEEE	356	WHKTWRLR
267	DRLHWPRR	297	RSWFDQRR	327	DFKQKDME	357	EHWKNRLR
268	HRDWPRNY	298	WHKTDRDA	328	EQMQFRVK	358	HMKFKKYR
269	RHTHRYPK	299	EEKWREHW	329	WAIRDHPY	359	QWKRHKYY
270	KEHKWPRR	300	KDPEQWKR	330	THDPPRNY	360	RYKAKKIK

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
361	RSWFKWHV	391	VFKDTKFI	421	MCKYLPYN	451	WRLRMDKS
362	FRVKWNTK	392	HMKFHCNV	422	WFFHPKRK	452	WPRREEMN
363	YVRRPRNY	393	DKIMWRLR	423	LPAVKCRK	453	WPRRHSED
364	YRQQRYPK	394	HFHERVLR	424	RYPKWFFH	454	MNKEMVLF
365	EHEDWNTK	395	KKYRMEKF	425	YRQQLPYN	455	NYPLDRPW
366	EHWKCEDC	396	WNTKYVRR	426	QWKRIVFF	456	WFFHKEDH
367	EDACWRLR	397	KGIMWPRR	427	HKYYYWHQ	457	AERETWHE
368	REHWWNWW	398	CRHIKKYR	428	DFEMRYKA	458	EKRWHFHE
369	LTRDIHIL	399	RSWFRPRS	429	MDEIYRQQ	459	VHWERYNE
370	IVFFHRHK	400	PKRKHNMK	430	WSDNNRLR	460	KHWNRHTH
371	WFFHHDRD	401	SDRWHKRY	431	KCRKNWDH	461	KWESEKKE
372	MVSQHKRY	402	VYKYKNMP	432	RVLRYWHQ	462	TRIWREAN
373	WNWWEKKE	403	YVRRQWKR	433	PRNYQEWE	463	WRLRKHID
374	HFFNHRDW	404	WRLRRVLR	434	KKYREWAI	464	RRTMVKRE
375	RIDHRSWF	405	QWKRWRLR	435	FKPPYVRR	465	NYPLHFHE
376	QERKCRNR	406	WFFHKDME	436	VFRCRYPK	466	WNWWHTQL
377	KHWNGKHS	407	WIDKHEQD	437	YTRMWRLR	467	WFFHEHWK
378	KDEEWPRR	408	VFRCHLDD	438	KKYRWNTK	468	CYRKWHVQ
379	DRPWYVRR	409	KRFVEHED	439	RYKACYRK	469	FRVKAWCN
380	QWKRRDCH	410	HHRLDYQH	440	KKYRQKKF	470	PLFYWPRR
381	QWKRIRDR	411	SRREWFFH	441	EKRWRENH	471	YVRRWFFH
382	QWKRRKEH	412	WHVQQRYD	442	QKKFYAQR	472	WRLRMQAW
383	KKYRGDHR	413	VCQEDRPW	443	KKYRYVRR	473	YVRRCHLW
384	PRNYDAKK	414	QDRDKHWN	444	RRVTQWKR	474	EILNRSWF
385	NRLRDNRK	415	KREKFKKK	445	YHEHPESK	475	FRVKLKWE
386	PEMQCHLW	416	RENCRRTM	446	PVPFEKDM	476	HHRLEYYY
387	MVLFERFN	417	KDDENRLR	447	DHVPYTRM	477	FKPPCTNH
388	MQAWRYKA	418	KKYRHKRY	448	YKQKQDMT	478	HTQLRRTM
389	RPRSWFFH	419	RYPKRDHS	449	VFRCNLKD	479	FHKEWRLR
390	DMFDFKPP	420	FMPQWKEL	450	MDGHKKYR	480	RRTMWHKT

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
481	NCQETDDY	511	SDGDQTKT	541	PEDSKDEE	571	RQEENRHR
482	NDPPTYTD	512	DENDQCRR	542	NEDVGDHR	572	ESGEEADR
483	DPGTDEGD	513	KKVSDHHA	543	VTTVGHDD	573	PDEHRDCK
484	DENDDEND	514	QTKTDDEE	544	FEGLADKG	574	EDHDDRED
485	GGEPCEDC	515	CTGDARRR	545	ETDLDCTK	575	SYSDAERE
486	MSDAEEMN	516	ARRRDEGD	546	NHEDPKTG	576	HLDDCEDR
487	DNKLHNDG	517	SWGQREGD	547	ANRPCTGD	577	EHSGEVKQ
488	SDGDGHDD	518	GGHLEDAR	548	GPYRNEDV	578	EEMNHQQQ
489	PESKDAKK	519	KNMPEKVE	549	PPSKHAEN	579	CDDDYGRE
490	DEENRENH	520	KTGRNCKP	550	ETTARPRS	580	MNDEPESK
491	DDESGKHS	521	SDQSESHD	551	REANNYPL	581	PEDSLRDT
492	DNDTHRHK	522	DSNEDDCD	552	RCTDVTTV	582	GHDDRHSE
493	EEYEDRDA	523	DTCHCTGD	553	LNNPREAN	583	GGEPRVVE
494	DEDHDVDR	524	TECGEYQP	554	KDPEPEMQ	584	DPGTRYNE
495	DDEEEEDR	525	DTCAVSDK	555	ETDLAERE	585	CTGDEADR
496	QDMTEPNR	526	HEANEESQ	556	DCIQPKDS	586	DEENFQEE
497	HNDGEDKE	527	EQMQMDKS	557	KCRKREGD	587	TCNTGECE
498	SQDVRNCE	528	CTGDCDDD	558	PPSKEGIC	588	DDGHHGVR
499	DDCDDKHM	529	DRDADRLH	559	GCVHKTGR	589	EDACHGVR
500	DDGHKRED	530	REANQHTK	560	KCRKHGVR	590	IKHLEDHD
501	EDACDAKK	531	ETEKRNDK	561	DEGDEDHN	591	PKTGDEGD
502	DSNEREGD	532	RHTHKDEE	562	SYSDMNDE	592	QCRRNDPP
503	YGDERENH	533	DHDTGQHK	563	DYEEESGE	593	KTGREHSG
504	YGDPRDGC	534	EHEDEHEK	564	EDDADCDA	594	PRNYEDEV
505	SWGQDEGD	535	EDSHKQND	565	CDDDDDES	595	EERHPGIL
506	STPVETED	536	DTCHAKDR	566	EHSGENAD	596	IECNGDHR
507	QINCEEDD	537	DDESREGD	567	YDCDNEDV	597	EERHPKTG
508	EDDAEYYY	538	GECEDEKK	568	DKSERQEE	598	LTRDPKTG
509	VSDKHVTH	539	EHEDREHG	569	KAHEKRDG	599	ARRRKQDH
510	ADKGTCNT	540	EEDDDNRK	570	REGDNNER	600	YRQQISSD

Peptide No.	Sequence	Peptide No.	Sequence
601	NDDDDPGT	631	NNERPGIL
602	SQDVDDEE	632	KTHKEETI
603	REHGRRRE	633	NNERGCQG
604	EHEKQDRD	634	EQRSTLYD
605	EHHKSRRE	635	FSTDKRDG
606	NDDDEIRD	636	TCNTRCTD
607	DEGDKHHD	637	EADRRPRS
608	EEMNQHTK	638	ARRRRSKD
609	NPDEKDDE	639	EYYYPKTG
610	CAEEMNKE	640	YVRRGCQG
611	SDGDHQQQ		
612	HSEDGDHR		
613	DEDHEHHK		
614	ENADDRDA		
615	GQECDKSE		
616	TECGKRDG		
617	NPDEEDAR		
618	EHEDSSHA		
619	TQAAEEMN		
620	GCQGDCTK		
621	CEDCGPYR		
622	CTGDCVVR		
623	DHDTLTER		
624	SARTDTCH		
625	HKYYSDGD		
626	DECTPKRK		
627	NMECKTGR		
628	DTCAKTGR		
629	RDKDVTTV		
630	DKSEQINC		

Table 3-4　各主成分分析における変数の一覧

		No.1	No.2	No.3	No.4
Number of variables		49	39	43	33
Polarity	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Side-chain contribution to protein stability	Average	○	○	○	-
	Maximum	○	○	○	-
	Minimum	○	○	○	-
	Position of maximum	○	○	○	-
	Position of minimum	○	○	○	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	-
Isoelectric point	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Hydropathy index	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Molecular weight	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○

	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
LogP	Average	-	-	-	-
	Maximum	○	○	-	○
	Minimum	○	○	-	○
	Position of maximum	○	○	-	○
	Position of minimum	○	○	-	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	-	○
The number of the group in peptides	Group 1	○	○	○	○
	Group 2	○	○	○	○
	Group 3	○	○	○	○
	Group 4	○	○	○	○
Pk1	Maximum	○	-	-	-
	Minimum	○	-	-	-
	Position of maximum	○	-	-	-
	Position of minimum	○	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	-
Pk2	Maximum	○	-	-	-
	Minimum	○	-	-	-
	Position of maximum	○	-	-	-
	Position of minimum	○	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	-
Proportion of Variance	PC1	0.14	0.17	0.17	0.18
	PC2	0.10	0.11	0.13	0.11
Cumulative Proportion		0.24	0.28	0.29	0.30

		No.5	No.6	No.7	No.8
Number of variables		33	28	28	27
Polarity	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Side-chain contribution to protein stability	Average	○	-	○	-
	Maximum	○	-	○	-
	Minimum	○	-	○	-
	Position of maximum	○	-	○	-
	Position of minimum	○	-	○	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	○	-
Isoelectric point	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Hydropathy index	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	○	○	○
	Position of minimum	○	○	○	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	○	○
Molecular weight	Average	○	○	-	-
	Maximum	○	○	-	-
	Minimum	○	○	-	-
	Position of maximum	○	○	-	-
	Position of minimum	○	○	-	-

	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	○	-	-
LogP	Average	-	-	-	-
	Maximum	○	-	-	○
	Minimum	○	-	-	○
	Position of maximum	○	-	-	○
	Position of minimum	○	-	-	○
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	○
The number of the group in peptides	Group 1	○	○	○	○
	Group 2	○	○	○	○
	Group 3	○	○	○	○
	Group 4	○	○	○	○
Pk1	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Pk2	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Proportion of Variance	PC1	0.19	0.19	0.20	0.22
	PC2	0.12	0.13	0.13	0.13
Cumulative Proportion		0.31	0.32	0.33	0.35

		No.9	No.10	No.11	No.12
Number of variables		22	18	16	16
Polarity	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	-	-	-
	Position of minimum	○	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	-
Side-chain contribution to protein stability	Average	-	○	-	-
	Maximum	-	○	-	-
	Minimum	-	○	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Isoelectric point	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	-	-	-
	Position of minimum	○	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	-
Hydropathy index	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	○	-	-	-
	Position of minimum	○	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	○	-	-	-
Molecular weight	Average	-	○	-	○
	Maximum	-	○	-	○
	Minimum	-	○	-	○
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-

	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
LogP	Average	-	○	○	-
	Maximum	-	○	○	-
	Minimum	-	○	○	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
The number of the group in peptides	Group 1	○	-	○	○
	Group 2	○	-	○	○
	Group 3	○	-	○	○
	Group 4	○	-	○	○
Pk1	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Pk2	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Proportion of Variance	PC1	0.23	0.35	0.41	0.34
	PC2	0.16	0.21	0.21	0.22
Cumulative Proportion		0.39	0.56	0.62	0.56

		No.13	No.14	No.15	No.16
Number of variables		16	13	13	9
Polarity	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Side-chain contribution to protein stability	Average	○	-	-	-
	Maximum	○	-	-	-
	Minimum	○	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Isoelectric point	Average	○	○	-	○
	Maximum	○	○	-	○
	Minimum	○	○	-	○
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Hydropathy index	Average	○	○	○	○
	Maximum	○	○	○	○
	Minimum	○	○	○	○
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Molecular weight	Average	-	-	-	-
	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-

	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
LogP	Average	-	-	○	-
	Maximum	-	-	○	-
	Minimum	-	-	○	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
The number of the group in peptides	Group 1	○	○	○	-
	Group 2	○	○	○	-
	Group 3	○	○	○	-
	Group 4	○	○	○	-
Pk1	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Pk2	Maximum	-	-	-	-
	Minimum	-	-	-	-
	Position of maximum	-	-	-	-
	Position of minimum	-	-	-	-
	Difference between the positions of the maximum and the minimum	-	-	-	-
Proportion of Variance	PC1	0.34	0.39	0.47	0.43
	PC2	0.23	0.26	0.14	0.24
Cumulative Proportion		0.57	0.64	0.61	0.67

Table 3-5　IL-2 受容体由来の 8 残基ペプチドライブラリーの各結合ルールにおける蛍光強度値の平均、標準偏差、ペプチド数

IL-2

	平均	標準偏差	ペプチド数
高結合性ルール	2233707	407662	59
低結合性ルール	1222325	879272	47
中結合性ルール	2436329	695693	128

IgG

	平均	標準偏差	ペプチド数
高結合性ルール	4021037	764934	31
低結合性ルール	764934	79927	24
中結合性ルール	2184281	350052	179

各ルールは、Fig. 3-6 における蛍光強度値の平均や標準偏差、ペプチド数から構築した。

Table 3-6　新規 8 残基ペプチドライブラリーの各結合ルールにおける蛍光強度値の平均、標準偏差、ペプチド数

IL-2

	平均	標準偏差	ペプチド数
高結合性ルール	89125	28846	128
低結合性ルール	26937	26472	140
中結合性ルール	70806	27159	372

IgG

	平均	標準偏差	ペプチド数
高結合性ルール	213481	16755	103
低結合性ルール	102782	7464	74
中結合性ルール	152196	13007	463

各ルールは、Fig. 3-7 における蛍光強度値の平均や標準偏差、ペプチド数から構築した。

3.5. 結言

物理化学的性質を用いる本解析手法は、ペプチドの結合性評価に用いるライブライリーのサイズを効果的に縮小できた。また、主成分分析は主成分プロットにおけるペプチドの高／低結合性領域を特定できる可能性を持ち、本章では主成分分析を用いて結合性領域の特定を4残基ペプチドから8残基ペプチドに拡大することに成功した。本結果は、長鎖のペプチドの結合性を、より短鎖のペプチドの結合性から予測できることを示している。加えて、本手法では探索の候補となる8残基ペプチドの数を2.56×10^{10}から512まで縮小できた。従って、本手法はペプチド性リガンドの効果的・合理的な開発において重要なツールとなると考えられる。

3.6. 参考文献

1. **Terpe, K.**: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, Appl. Microbiol. Biotechnol., **60**, 523–533 (2003).
2. **Waibel, R., Alberto, R., Willuda, J., Finnern, R., Schibli, R., Stichelberger, A., Egli, A., Abram, U., Mach, J. P., Plückthun, A., and Schubiger, P. A.**: Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex, Nat. biotechnol., **17**, 897–901 (1999).
3. **Hopp, T. P., Pricket, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Ceretti, D. P., Urdal, D. L., and Conlon, P. J.**: A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification, Nat. Biotechnol., **6**, 1204–1210 (1988).
4. **Murray, A., Sekowski, M., Spencer, D. I. R., Denton, G., and Price, M. R.**: Purification of monoclonal antibodies by epitope and mimotope affinity chromatography, J. Chromatogr. A, **782**, 49–54 (1997).
5. **Murray, A., Spencer, D. I. R., Missailidis, S., Denton, G., and Price, M. R.**: Design of ligands for the purification of anti-MUC1 antibodies by peptide epitope affinity chromatography, J. Peptide Res., **52**, 375–383 (1998).
6. **Roque, A. C. A., Lowe, C. R., and Taipa, M. A.**: Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification, Biotechnol. Prog., **20**, 639–654 (2004).
7. **Chen, X., Conti, P. S., and Moats, R. A.**: *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of integrin αvβ3 in brain tumor xenografts, Cancer Res., **64**, 8009–8014 (2004).
8. **Qiao, Y., Tang, H., Munske, G. R., Dutta, P., Ivory, C. F., and Dong**, **W. J.**: Enhanced fluorescence anisotropy assay for human cardiac troponin I and T detection, J. Fluoresc., **21**, 2101–2110 (2011).
9. **Sapsford, K. E., Blanco-Canosa, J. B., Dawson, P. E., and Medintz, I. L.**: Detection

of HIV-1 specific monoclonal antibodies using enhancement of dye-labeled antigenic peptides, Bioconjug. Chem., **21**, 393–398 (2010).

10. **Wang, X. H., Wang, C. Y., Qu, K. G., Song, Y. J., Ren, J. S., Miyoshi, D., Sugimoto, N., and Qu, X. G.**: Ultrasensitive and selective detection of a prognostic indicator in early-stage cancer using graphene oxide and carbon nanotubes, Adv. Funct. Mater., **20**, 3967–3971 (2010).
11. **Izdebska, M., Gagat, M., Grzanka, D., and Grzanka, A.**: Ultrastructural localization of F-actin using phalloidin and quantum dots in HL-60 promyelocytic leukemia cell line after cell death induction by arsenic trioxide, Acta Histochem., 115, 487–495 (2013).
12. **Smith, G. P.**: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, Science, **228**, 1315–1317 (1985).
13. **Lam, K. S., Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M., and Knapp, R. J.**: A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity, Nature, **354**, 82–84 (1991).
14. **Lebl, M., Krchnak, V., Sepetov, N. F., Seligmann, B., Strop, P., Felder, S., and Lam, K. S.**: One-bead-one-structure combinatorial libraries, Biopolymers, **37**, 177-198 (1995).
15. **Fassina, G., Ruvo, M., Palombo, G., Verdoliva, A., and Marino, M.**: Novel ligands for the affinity-chromatographic purification of antibodies, J. Biochem. Biophys. Methods, **49**, 481–490 2001
16. **Fassina, G., Verdoliva, A., Odierna, M. R., Ruvo, M., and Cassini, G.**: Protein a mimetic peptide ligand for affinity purification of antibodies, J. Mol. Recognit., **9**, 564–569 (1996).
17. **Sandin, C., Linse, S., Areschoug, T., Woof, J. M., Reinholdt, J., and Lindahl, G.**: Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide, J. Immunol., **169**, 1357–1364 (2002).

18. **Palombo, G., Verdoliva, A., and Fassina, G.**: Affinity purification of immunoglobulin M using a novel synthetic ligand, J. Chromatogr. B, **715**, 137–145 (1998).
19. **Hatanaka, T., Ohzono, S., Park, M., Sakamoto, K., Tsukamoto, S., Sugita, R., Ishitobi, H., Mori, T., Ito, O., Sorajo, K., Sugimura, K., Ham, S., and Ito, Y.**: Human IgA-binding peptides selected form random peptide libraries: affinity maturation and application in IgA purification, J. Biol. Chem., **287**, 43126–43136 (2012).
20. **Wang, F. Y., Guo, J. Q., and Zhang, G. P.**: Analysis of the linear epitope for Fc-binding on the mouse IgG Fc receptor (moFcγR1) by synthetic peptide, Genet. Mol. Res., **13**, 4647–4653 (2014).
21. **Burden, F. R., and Winkler, D. A.**: Predictive Bayesian neural network models of MHC class II peptide binding, J. Mol. Graph. Model, **23**, 481–489 (2005).
22. **Brusic, V., Rudy, G., Honeyman, G., Hammer, J., and Harrison, L.**: Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network, Bioinformatics, **14**, 121–130 (1998).
23. **Singh, H. and Raghava, G. P.**: ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics, **17**, 1236–1237 (2001).
24. **Tung, C. W., and Ho, S. Y.**: POPI: predicting immunogenicity of MHC class I binding peptides by mining informative physicochemical properties, Bioinformatics, **23**, 942–949 (2007).
25. **Salomon, J., and Flower, D. R.**: Predicting class II MHC-peptide binding: a kernel based approach using similarity scores, BMC Bioinformatics, **7**, 501 (2006).
26. **Zhang, G. L., Bozic, I., Kwoh, C. K., August, J. T., and Brusic, V.**: Prediction of supertype-specific HLA class I binding peptides using support vector machines, J. Immunol. Methods, **320**, 143–154 (2007).
27. **Kaga, C., Okochi, M., Tomita, Y., Kato, R., and Honda, H.**: Computationally assisted

screening and design of cell-interactive peptides by a cell-based assay using peptide arrays and a fuzzy neural network algorithm, Biotechniques, **44**: 393–402 (2008).

28. **Takeshita, T., Okochi, M., Kato, R., Kaga, C., Tomita, Y., Nagaoka, S., and Honda, H.**: Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis, J. Biosci. Bioeng., **112**, 92–97 (2011).
29. **Kume, A., Okochi, M., Shimizu, K., Yoshida, Y., and Honda, H.**: Development of a tactical screening method to investigate the characteristics of functional peptides, Biotechnol. Bioprocess. Eng., **21**, 119-127 (2016).
30. **Ringnér, M.**: What is principal component analysis?, Nature Biotechnol., **26**, 303–304 (2008).
31. **Zimmerman. J. M., Eliezer, N., and Simha, R.**: The characterization of amino acid sequences in protein by statistical methods, J. Theoret. Biol., **21**, 170–201 (1968).
32. **Kyte, J., and Doolittle, R. F.**: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol., **157**, 105–132 (1982).
33. **Takano, K., and Yutani, K.**: A new scale for side-chain contribution to protein stability based on the empirical stability analysis of mutant proteins, Protein Eng., **14**, 525–528 (2001).
34. **Zamyatin, A. A.**: Protein volume in solution, Prog. Biophys. Mol. Biol., **24**, 107-123 (1972).
35. **David, L. N., and Michael, M. C.,**: Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., p. 118, Worth Pub, UK (2000).
36. **Futamura, Y., Kawatani, M., Kazami, S., Tanaka, K., Muroi, M., Shimizu, T., Tomita, K., Watanabe, N., and Osada, H.**: Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. Chem. Biol., **19**, 1620–1630 (2012).

37. **Ringnér, M.**: What is principal component analysis? Nat. Biotechnol., **26**, 303–304 (2008).

38. **Tarasova, N., K., Ytterberg, A., J., Lundberg, K., Zhang, X., M., Harris, R., A., Zubarev, R., A.**: Proteomics reveals a role for attachment in monocyte differentiation into efficient proinflammatory macrophages. J. Proteome. Res., **14**, 3940–3947 (2015).

39. **Kaga, C., Okochi, M., Nakanishi, M., Hayashi, H., Kato, R., and Honda, H.**: Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death. Biochemical and Biophysical Research Communications., **362**, 1063–1068 (2007).

第 4 章

結論

本論文では、アミノ酸の物理化学的性質を用いて、機能性ペプチド探索のためのライブラリーを簡便で戦略的に設計する手法について述べた。

まず第 1 章は序論であり、標的タンパク質に対するペプチドの結合性評価モデルの開発における課題と本研究の目的を述べた。

第 2 章では、スポット固相合成法で作製したペプチドアレイを用いて、わずかな数のペプチドから標的分子に対して高結合性を示す機能性ペプチドを探索できた。機能性ペプチドをより簡便で戦略的に探索するために、20 種類のアミノ酸をその物理化学的性質から非電荷高疎水性の group 1、非電荷低疎水性の group 2、正電荷性の group 3、負電荷性の group 4 という 4 group に分類し、これを網羅する 256 種のペプチド（$4^4 = 256$）を含んだ 4 残基ペプチドライブラリーを作製した。物理化学的性質による分類の有用性を検証するために、まず、本研究以前に得られていた細胞高接着性ペプチドや胆汁酸高結合性ペプチド、微粒子高結合性ペプチドの配列データに本研究の分類法を当てはめた。その結果、標的分子に特異的な物理化学的性質のルールを抽出できた。次に、新たなモデルタンパク質として IL-2 と IgG を用いて、4 group を網羅する 4 残基ペプチドライブラリーから IL-2 と IgG に対する高結合性ペプチドの探索を行った。その結果、IL-2 に対しては「1 残基目には group 1 または 4、2 残基目と 4 残基目には group 1」、IgG に対しては「1 残基目と 3 残基目には group 3」といっ

たように、各タンパク質に対して特徴的な物理化学的性質のルールが得られた。従って、本章で開発したペプチドライブラリーは標的タンパク質の結合性評価において十分なペプチド数を有しており、本結合評価法は目的分子に対して高結合性を示すペプチドを簡便で戦略的に探索でき、機能性ペプチドの開発において有用であることを示した。

第 3 章では、標的タンパク質に対する 4 残基ペプチドライブラリーの結合親和性における主成分分析結果から、8 残基ペプチドライブラリーにおける高結合性／低結合性ペプチドを分類できた。まず、IL-2 と IgG をモデル標的タンパク質とし、ペプチドアレイを用いて 512 ペプチドを含む 4 残基ペプチドライブラリー対する標的への結合親和性を評価した。次に、ペプチド配列の特徴を明らかにするため、本 4 残基ペプチドライブラリーの主成分分析を実施し、ペプチドの物理化学的特徴を表す変数を 2 つの主成分（PC）に圧縮した。この結合親和性を主成分プロットに展開すると、IL-2 においては 16 変数、IgG においては 18 変数から構成される主成分分析において、それぞれの高結合性ペプチドと低結合性ペプチドのプロットが局在化しており、結合性を分類するのに適していた。更に、この 4 残基ペプチドの主成分分析から得られた結合性の傾向を用いて、より長鎖である 8 残基ペプチドの結合性の傾向を予測できるか検証した。その結果、IL-2 と IgG の双方において、8 残基の高結合性ペプチドは、4 残基の高結合性ペプチドの主成分プロット周辺に濃縮されることが判明した。低結合性ペプチドの平均蛍光強度と比較した高結合性ペプチドの平均蛍光強度は、それぞれ IL-2 で 3.3 倍、IgG で 2.1 倍高かった。本結果より、第 2 章で構築した 4 残基ペプチドライブラリーの主成分分析結果を用いて、8 残基ペプチドにおける高結合性と低結合性を区別できることが判明した。従って、本章で開発した手法は、標的分子に高結合性または低結合性を持つ 8 残基ペプチドを 4 残基のペプチドライブラリーから特定できることから、より長鎖の機能性ペプチドの開発において有用であることを示した。

今後、生体分子に対するペプチドの生理活性の解明が進む中、標的分子に高結合

性あるいは低結合性を示す機能性ペプチドの開発が目覚ましく発展することが予想される。本来、機能性ペプチドの探索には、膨大な組み合わせの候補ペプチドと労力必要である。そこで本研究のように、アミノ酸の物理化学的特徴と結合実験から得た親和性データを元に候補ペプチドを最適化することで、有用な機能性ペプチド開発の促進につながることを期待する。

研究業績

本博士論文に関係する発表論文

1. **Akiko Kume**, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Yasuko Yoshida, Hiroyuki Honda: Development of a tactical screening method to investigate the characteristics of functional peptides. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(1):119-127, 2016
2. **Akiko Kume**, Shun Kawai, Ryuji Kato, Shinmei Iwata, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Exploring high-affinity binding properties of octamer peptides by principal component analysis of tetramer peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, in press

学会

1. **Akiko Kume**, Mina Okochi, Hiroyuki Honda: Screening of cytokine binding peptides using peptide array and computational analysis of binding peptide sequences, *IGER Annual meeting 2013*, Aichi, Japan, January 8, p. 2, 2014 (Poster)
2. **Akiko Kume**, Mina Okochi, Hiroyuki Honda: Characterization of cytokine binding peptides by computational analysis, *IGER Annual meeting 2014*, Aichi, Japan, December 18, p. 9, 2014 (Poster)
3. **Akiko Kume**, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Screening of cytokine binding peptides with peptide arrays and analysis of their sequence rules, *The society of chemical engineers Japan (SCEJ) 80th Annual Meeting*, Tokyo, Japan, March 19-21, p.

30, 2015 (Poster)

4. **Akiko Kume**, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Characterization of sequence rules for cytokine binding peptides using peptide array and computational analysis, *IGER Annual meeting 2015*, Aichi, Japan, January 8, pp. 2-3, 2016 (Poster)
5. Shinmei Iwata, **Akiko Kume**, Shun Kawai, Ryuji Kato, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Design and analysis of protein binding octamer peptides by physicochemical characteristics of tetramer peptides, *The society for biotechnology (SBJ) 68th Annual Meeting*, Toyama, Japan, September 28-30, p. 56, 2016 (Oral)

謝辞

本研究の遂行、ならびに本論文をまとめるに際して、終始懇切なるご指導とご鞭撻を頂きました、名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻の本多裕之教授に深く感謝の意をささげます。また、本論文の作成に当たり有益なご助言を頂きました、名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻の飯島信司教授、清水一憲准教授、名古屋大学大学院生命農学研生命技術科学専攻の中野秀雄教授、名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻の加藤竜司准教授には、深く感謝いたします。

研究当初より本日に至るまで、日々の研究を通じて終始有益なご指導とご助言を頂きました、名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻の蟹江慧助教、東京工業大学大学院理工学研究科化学工学専攻の大河内美奈教授に、心から感謝の気持ちを捧げます。

最後に、本研究を進めるに当たり協力頂きました、名古屋大学大学院工学研究科生物機能工学分野バイオテクノロジー講座の卒業生・在校生の皆様に深く感謝いたします。特に、「ペプチド」チームとして日々大変お世話になりました岡崎宜恭君、杉浦寿之君、田邊智哉君、荻原沙緒理さん、魚井清香さん、松本凌君、山内望さん、岩田晋明君、小崎一功君、今井健人君、長島拓則君、及び、牛田泰徳博士、杉田智哉博士、佐々木寛人博士、山本修平博士、河合駿博士に深く感謝いたします。

2017 年　1 月　久米　暁子