

報告番号	甲 第 11914 号
------	-------------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 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)

氏 名 久米 暁子

## 論 文 内 容 の 要 旨

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。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。組織工学分野でも、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 NSPVNSKIPKACCVPTLSAI による骨誘導などがある。

ペプチドは 20 種のアミノ酸が連なった分子であるため、その配列の組合せは膨大である。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、配列の組合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や、コンビナトリアルースプリット合成法、ビーズディスプレイ法等が、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、 $10^5$ – $10^9$  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、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。

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 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。ライブラリーサイズは上記手法に比べ劣るものの利点としては、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。

私が所属する研究室はこのペプチドアレイ法を用いて、これまでに様々な機能性ペプチドの探索に成功してきた。2212 種類のランダムに設計した 6 残基ペプチドライブラリーから、胆汁酸高結合性ペプチドを探索した。しかし、ランダムライブラリーでは、ペプチドの種類が、結合性評価に十分な数であるかは不明である。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、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。

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、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り、その解析は容易ではない。

そこで、統計解析の手法を取り入れた研究が生化学分野、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。物理化学的性質を変数とした多次元解析によるタンパク質-ペプチドの結合性評価も行われており、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ており、遺伝子発現解析などの生物学的研究にも広く使われてきている。

そこで私は、ペプチドアレイと、アミノ酸の物理化学的性質の統計解析を用いて、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構築をすることで、標的分子への結合性が定量的に評価可能で、簡便・戦略的な機能性ペプチドの探索モデルが構築できるのではないかと考えた。しかし、その上で 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ではライブラリーサイズが膨大になるという課題が未だ残されていた。

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の統計解析を用いて、以下のような戦略的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評価モデル構築を行うことで、上記の課題を解決し、新規の機能性ペプチド探索への応用を目指した。

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) に対して、上記4残基ペプチドライブラリーの結合性の傾向を評価した。その際に、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 ( $20^8 = 2.56 \times 10^{10}$  ペプチド) より、大幅に縮小できた。

以上より、本論文では標的タンパク質に対するペプチドの結合性評価モデルを構築し、標的分子に対して高結合性を示す機能性ペプチドの簡便・戦略的な探索のためのスクリーニングアレイ構築(第2章)、および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構築(第3章)に応用した。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。