



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.121

2021年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<https://peptide-soc.jp/>

細胞外膜小胞の高感度検出を基軸とした 曲率認識ペプチドの創製研究

1. はじめに

京都大学大学院薬学研究科
薬品機能解析学分野の河野健一と申します。この度は、本誌に寄稿する機会を頂きました事を大変栄誉に感じております。お声かけ頂きました武庫川女子大学薬学部の矢野義明教授に心より厚く御礼を申し上げます。本稿では、培養液中で細菌が産生する細胞外膜小胞 (extracellular membrane vesicle: EMV) を簡便で迅速に検出する事が可能な曲率認識ペプチドの創製研究についてご紹介させていただきます。



河野 健一

2. 背景

EMV は細菌から産生される直径 30 – 200 nm 前後の脂質ナノ粒子であり、細菌間コミュニケーションで重要な役割を果たしています¹。EMV はヒトの病気や細菌の病原性に関連している為、病気の診断やワクチンへの応用などバイオテクノロジー面で幅広く活用されています^{2,3}。EMV の特性を理解する為には、培養液中で EMV を無傷の状態を検出する事が重要です。しかしながら、既存手法では検出に至るまでの分離・回収過程で多くの問題を抱えています。例えば、汎用されている高速遠心分離は EMV と産生細菌の分離に長時間 (数時間～半日程度) を要するだけでなく、遠心力によって EMV に過度な重力負荷がかかる為に EMV の凝集や形状変化を引き起こす可能性があります。また、免疫沈降法は抗体を用いて EMV に含まれる抗原を高感度で検出できる反面、抗原発現量に依存した評価法であり、抗原欠損体の EMV 検出には向かないデメリットがあります。これらの問題に取り組む為に、私たちは脂質小胞に結合する曲率認識ペプチドに着目しました。一般的に、平面膜に比べて脂質小胞

表 1 BAR ドメインファミリーに由来する曲率認識ペプチド。アンダーラインは両親媒性 α ヘリックス構造を取ると予想される配列部位を指す。曲率認識部位の C 末端側に GSGSK リンカーを付加して Lys 残基の側鎖に NBD 色素を標識した。C 末端は全てアミド化されている。

ペプチド	配列 (X = ノルロイシン, B = ジメチルグリシン)
END-NBD	<u>SVAGLKKQFHKATQKVSE</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
AMP-NBD	<u>FAKNVQKRLNRAQEKVLQ</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
NDR-NBD	<u>XKKQFNRRXQLANQTVGR</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
BRAP-NBD	<u>AAGLFAKQVQKKFSRAQE</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
PICK-NBD	<u>SLDIVLKKVKHRLVENXS</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
SNX1-NBD	<u>GAGLLKXFNKATDAVSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
SNX4-NBD	<u>TGFQLKADSRLKALNATF</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
ARF-NBD	<u>FDIVKKWGINTYKCTKQL</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
OP-NBD	<u>XGHPPLEFSDCYLDSPDF</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
CB-NBD	<u>SPRFRAALEEVEGDVAEL</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
F8L-NBD	<u>GAGLLKXLNKATDAVSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
V15L-NBD	<u>GAGLLKXFNKATDALSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
A11B, 14B-NBD	<u>GAGLLKXFNKBTDBVSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
D13K-NBD	<u>GAGLLKXFNKATKAVSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
6K-NBD	<u>KKK-GAGLLKXFNKATDAVSKX-KKK</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂
FAAV-NBD	<u>GAGLLKXLNKBTDVLSKX</u> -GSGSK(NBD)-NH ₂

は高度に湾曲した膜構造を持っている為、脂質分子間でパッキングに間隙（脂質パッキング欠損部位）が生じます⁴。曲率認識ペプチドは脂質小胞の脂質パッキング欠損部位を認識して数分以内に結合する為、抗原に依存しない新規の EMV 検出法として応用できるのではないかと考えました。私たちは曲率認識ペプチドを用いて、EMV 産生細菌と分離することなく培地中に分泌された EMV を迅速・簡便に検出する手法の開発に取り組みました。

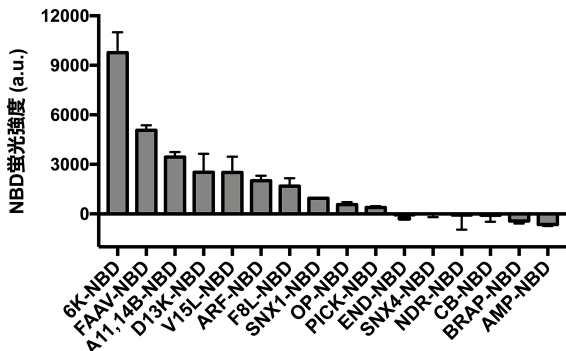


図1 精製した EMV に対する結合能のスクリーニング実験

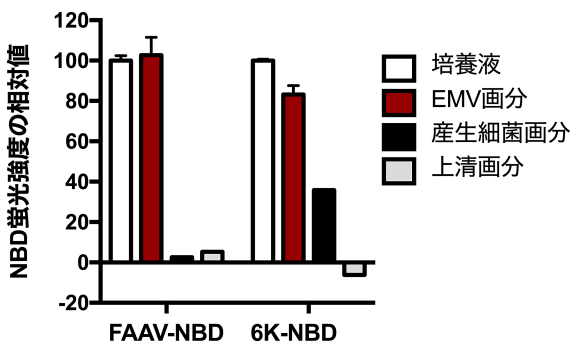


図2 培養液中での EMV 特異的結合の評価試験。培養液中での NBD 蛍光強度を 100%とした時の相対値を示す。

3. 曲率認識ペプチドの創製

曲率認識ペプチドの設計を行うにあたり、細胞内で小胞輸送やエンドサイトーシスなどの生命現象で曲率認識に関与する Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) ドメインタンパク質ファミリーに着目しました。現在、生体内には 70 種類以上の BAR タンパク質が確認されており、中でも両親媒性 α ヘリックス構造を取るドメインが曲率認識に重要であると考えられています⁵。曲率認識ドメインは水中ではランダム構造を取りますが、高曲率をもつ脂質小胞に結合する際に α ヘリックス構造を形成して、疎水面側を脂質パッキング欠損部位に挿入する事が報告されています⁶。また、脂質小胞の半径が小さくなる程曲率は大きくなり、膜表面の脂質パッキング欠損部位の数（結合サイト）が増える為、より多くの曲率認識ドメインが結合する事で曲率指向性が生まれます⁷。

私たちは、二次構造情報を元に、様々な BAR タンパク質から両親媒性 α ヘリックス構造を取ると予想される部位を選出し、Fmoc 固相合成法により対応するペプチドを 11 種類作製しました⁵。伸長反応後、曲率認識ペプチドの C 末端の Lys 側鎖に疎水性環境下で蛍光を強く発する色素 nitrobenzoxadiazole (NBD) を蛍光標識しました。脂質小胞への結合は、NBD 色素の蛍光強度変化に基づいて評価を行いました。人工脂質小胞（リポソーム）（直径 50 および 120 nm）に対する結合能評価を行い、その中から最も曲率認識能の高い sorting nexin 1 (SNX1) タンパク質由来のペプチドをシードペプチドとして選出しました。 α ヘリシティと脂質小胞結合能に密接な相関関係がある事を見出した私たちは、シードペプチドの SNX1 に様々な改変を加えて、構造活性相関の研究に於いて最も優れた曲率認識ペプチド FAHV を創製しました⁵。

4. 曲率認識ペプチドの性能評価

次に FAHV が培養液中で EMV 検出に適応可能かどうかを試験しました。モデル細菌として、高純度の積荷タンパク質を含む均一な大きさの EMV を大量に産

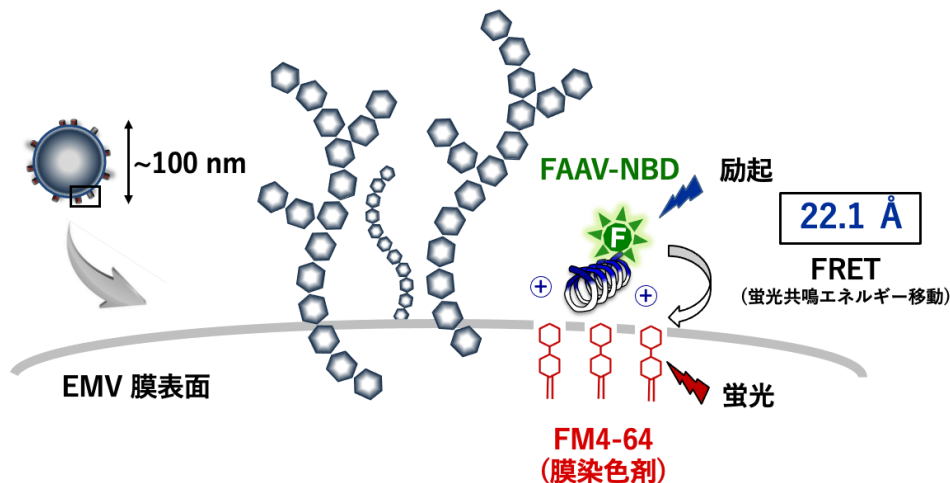


図3 FRET 現象の模式図。EMV 膜表面からの FAHV-NBD の結合距離の算出に FRET を利用した。

生するグラム陰性菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 株を使用しました⁸。培養液中には EMV の他に EMV 産生細菌や、プロテアーゼなどの分泌物も含まれており、リポソームを用いた純粋な系とは全く異なった複雑環境下での小胞検出能力が求められます。そこで、以下に示す 3 つの基準を設けて、その基準に満たすかどうかを調べる事で EMV 検出への適応性を評価しました。

第一基準：EMV と EMV 産生細菌を識別できる事。EMV は細菌から産生される為、両者の膜構成成分は類似しています。産生細菌の共存下でも EMV だけを識別して結合できる能力が必要となります。

第二基準：EMV 膜表面に結合して曲率認識能を発揮できる事。曲率認識ペプチドが膜曲率を認識する為には、膜表面に存在する脂質パッキング欠陥部位への結合が重要となってきます。その為、膜表面を覆うリポ多糖に捕捉されることなく、EMV 膜表面に結合する必要があります。

第三基準：プロテアーゼ耐性を有する事。曲率認識ペプチドは EMV 産生量の変動を追跡できるように、培養液での長時間使用が想定されます。その為、プロテアーゼ消化に対する耐性が必要となってきます。

これらの基準全てを満たす曲率認識ペプチドを特定する為に、以前の研究で報告した曲率感知ペプチド 11 種類⁵を用いて (表 1)、精製した EMV に対する結合能のスクリーニング実験を実行しました。そ

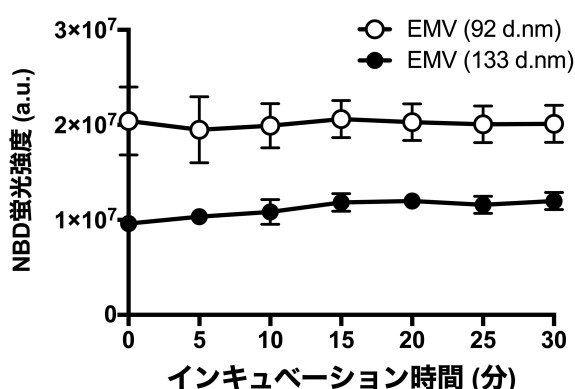


図 4 曲率認識能の評価試験。d.nm は直径の大きさ (nm) を示す。直径が小さい程、曲率は増加する。

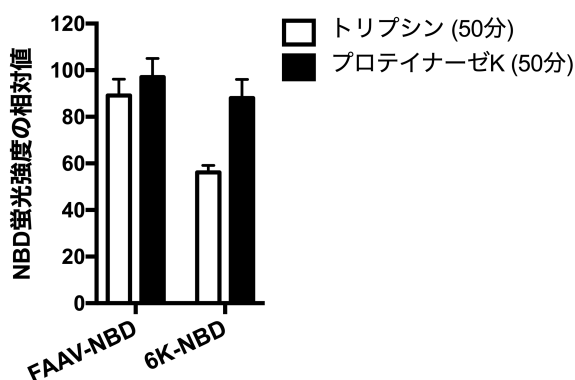


図 5 プロテアーゼ耐性試験。トリプシンおよびプロテイナーゼ K の処理開始時間 (0 分) における NBD 蛍光強度を 100% とした時の相対値を示す。

の結果、FAAV が 6K (6K は SNX1 の両端に Lys 残基を 3 つずつ付加した SNX1 誘導ペプチド) に次いで高い結合能を有する事が分かりました (図 1)。FAAV と 6K が産生細菌の存在下でも EMV に優先的に結合することを確認するために、産生細菌と EMV の両方を含む培養液と、培養液を遠心分離して得られた EMV 画分、産生細菌画分、および上清画分を準備しました。培養液中での FAAV の NBD 蛍光強度は EMV 画分と同程度であったのに対して、産生細菌画分と上清画分では蛍光強度の上昇は認められませんでした。一方、6K は EMV 画分だけでなく産生細菌画分でも NBD 蛍光強度の上昇が認められました (図 2)。この結果から、FAAV は培養液中で EMV に特異的に結合するのにに対して、6K は EMV と産生細菌の両方に結合する事が示唆されました。次に、FAAV が膜表面に結合している事を実証する為に、膜染色剤である [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)-hexatrienyl] pyridinium dibromide (FM4-64) で EMV 膜を染色しました⁹。FAAV が膜表面に近接している場合、FAAV に付加した NBD (ドナー) から FM4-64 (アクセプター) への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象が生じる為、FRET シグナルからドナーとアクセプター間の距離情報を算出できると考えました (図 3)。解析の結果、FAAV は EMV 膜から 22.1 Å の距離にある事が明らかになり、一般的な生体膜の厚みがおおよそ 40 Å である事を考慮した場合¹⁰、FAAV は EMV 膜表面に極めて近接した距離に結合している事が考えられました。また、実際に FAAV の曲率認識能を評価する為に、大きさの異なる 2 種類の EMV (直径 92 と 133 nm) を調製して結合試験を行ったところ、FAAV は曲率の小さい EMV (直径 133 nm) よりも曲率の大きい EMV (直径 92 nm) に対しておおよそ 2 倍高い蛍光強度を示した事から (図 4)、FAAV は曲率認識能を有する事が実験により示されました。最後に、プロテアーゼ耐性について試験をする為に、トリプシンとプロテイナーゼ K を用意しました。前者はリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸のカルボキシル側を切断するのに対して¹¹、後者は芳香族および疎水性アミノ酸のカルボキシル側を加水分解します¹²。コントロールペプチドとして用意した 6K をそれぞれのプロテアーゼと個別に 50 分間インキュベーションしたところ、前者に対して 45%、後者に対して 10% の割合で切断を受けていましたが、FAAV はどちらのプロテアーゼに対しても切断割合は 10% 未満である事が分かりました (図 5)。これらの事から、FAAV は上記に掲げた培養液中における EMV 検出に必要な基準全てを満たす最も優れたペプチドである事が証明されました。

5. 培養液中での EMV 検出への応用

培養液中での EMV 検出に対する FAAV の潜在的な適用可能性を試験しました (図 6 (A))。産生細菌を 96 ウェルプレートで培養した場合、EMV の産生量は脂質濃度換算で 45 - 70 μM の範囲で変動する事が分かりました。この変動幅を基軸にした場合、FAAV が培養液中の EMV 変化量に応じた検出感度を有するか

どうかを調べました。産生細菌の量を一定にした状態で、EMV 存在量を変化させた時の NBD の蛍光強度を測定したところ、NBD の蛍光強度は EMV 量が 5 倍に増加すると 1.7 倍に高くなり、EMV 量が 1/5 に減少すると 0.7 倍に低くなりました ($R = 0.97$) (図 6 (B))。EMV の検出感度を向上させる為に、NBD と FM4-64 間で生じる FRET 現象を EMV 検出に適応する事にしました。膜染色剤である FM4-64 の蛍光強度は EMV 量に比例する事から、NBD 標識した FFAV と FM4-64 による小胞認識の相乗効果により、EMV 変化量の高感度検出が可能になると考えました (FM4-64 は EMV と産生細菌の両方の膜を染色しますが、FAAV は EMV に特異的に結合する為、FRET シグナルは EMV のみに由来します) (図 6 (A))。解析の結果、EMV 量が 4 倍に増加すると FRET シグナルも 4 倍に高くなり、EMV 量が 1/4 に減少すると FRET シグナルは 1/100 倍に低下することが明らかになりました (図 6 (C))。EMV 量と FRET 値は高い相関係数 ($R = 0.99$) を示し、特に $23 \mu\text{M}$ 以上の濃度では高い直線性を示すデータが得られました。本手法は通常培養で見られる EMV 産生量を培養液中で検出できる事を示しており、EMV 検出に対する FFAV の潜在的な適用可能性を示す事に成功しました¹³。

6. おわりに

本研究では、曲率認識ペプチド FFAV を用いて EMV の *in-situ* 高感度検出をモデルグラム陰性菌

Shewanella vesiculosa HM13 株で例証しましたが、今後は EMV 生産量の少ない菌株への適応も見据えて、さらなる高感度検出が可能な曲率認識ペプチドの開発を進めて行きたいと考えています。また、曲率認識ペプチドは EMV の検出技術だけでなく、EMV の回収技術にも応用できる可能性を秘めています。多検体の EMV を短時間で効率的に回収する事が可能になれば、動物細胞や細菌から産生される EMV の未知なる機能の解明や医療への応用などにも貢献できる事が期待されますので、今後もより一層研究に邁進していきたい所存です。最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり、京都大学化学研究所の二木史朗教授と栗原達夫教授、川本純准教授、小川拓哉助教、横山文秋博士 (現、D-BSSE, ETH Zurich, Switzerland) に多大なご協力・ご支援をいただきました。この場を借りて心より厚く御礼を申し上げます。

参考文献

1. Schwechheimer, C.; Kuehn, M. J. Nat Rev Microbiol 2015, 13, 605–619.
2. Tan, K.; Li, R.; Huang, X.; Liu, Q. Front Microbiol 2018, 9, 783.
3. Jain, S.; Pillai, J. Int J Nanomedicine 2017, 12, 6329–6341.
4. Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.;

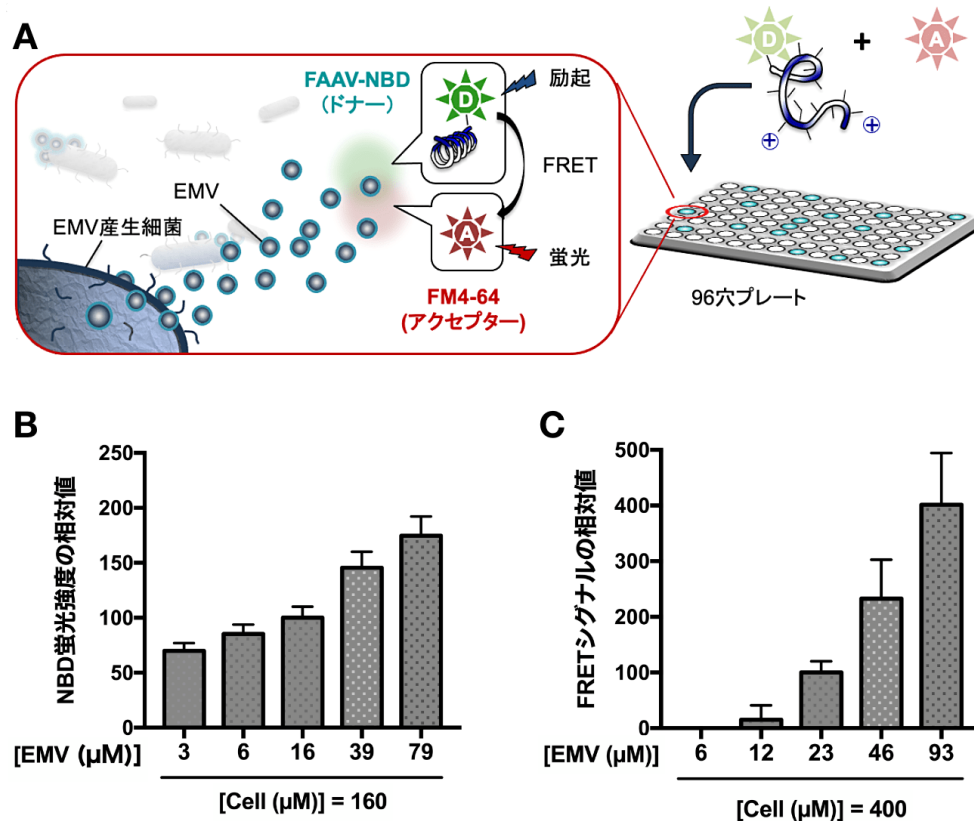


図 6 EMV の *in-situ* 検出試験。(A) FM4-64 と FFAV-NBD を用いた EMV の高感度検出の模式図。(B) FFAV-NBD 単独での EMV 検出試験 (相関係数: $R = 0.97$)。 (C) FM4-64 と FFAV-NBD 共存下での EMV 検出試験 ($R = 0.99$)。

- Futaki, S. *Angew Chem Int Ed* 2017, 56, 7644–7647.
- Kawano, K.; Ogushi, M.; Masuda, T.; Futaki, S. *Chem Pharm Bull* 2019, 67, 1131–1138.
 - Bigay, J.; Casella, J. F.; Drin, G.; Mesmin, B.; Antonny, B. *EMBO J* 2005, 24, 2244–2253.
 - Groves, J. T. *Nat Chem Biol* 2009, 5, 783–784.
 - Chen, C.; Kawamoto, J.; Kawai, S.; Tame, A.; Kato, C.; Imai, T.; Kurihara, T. *Front Microbiol* 2019, 10, 3001.
 - Pogliano, J.; Osborne, N.; Sharp, M. D.; Abanes-De Mello, A.; Perez, A.; Sun, Y. L.; Poglian, K. *Mol Microbiol* 1999, 31, 1149–1159.
 - Wilkins, M. H.; Blaurock, A. E.; Engelman, D. M. *Nat New Biol* 1971, 230, 72–76.
 - Luong, H. X.; Kim, D. H.; Lee, B. J.; Kim, Y. W. *Arch Pharm Res* 2017, 40, 1414–1419.
 - Cromm, P. M.; Spiegel, J.; Kuchler, P.; Dietrich, L.; Kriegesmann, J.; Wendt, M.; Goody, R. S.; Waldmann, H.; Grossmann, T. N. *ACS Chem Biol* 2016, 11, 2375–2382.
 - Kawano, K.; Yokoyama, F.; Kawamoto, J.; Ogawa, T.; Kurihara, T.; Futaki, S. *J Mol Biol* 2020, 432, 5876–5888.

かわの けんいち
 京都大学 大学院薬学研究科
 薬品機能解析学分野
 kawano.kenichi.2u@kyoto-u.ac.jp
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

高感度アミノ酸光学分割ラベル化剤の開発と応用

はじめに

創薬シーズ探索（単離・構造決定）において追い求めるべき理想的な化合物として、そのコストや副作用の面などから「ごく微量でも特定の強力な生物活性を示す化合物」が挙げられる。Specific な生物活性は副作用を伴わず、さらに微量でも有効であれば薬剤のコストを削減可能で、また必要投与量の低減による副作用の抑制も期待される。しかし、自然界においてそのような化合物を大量生産しては生産者そのものの生命活動や周りの生態系への影響が大きくなるため、通常そのような化合物は自然界からはごく微量しか得られない「稀少天然物」として存在する。自然界からごく微量しか得られない稀少天然物を対象とする研究ではそもそも化合物の発見が困難であり、さらに発見後も試料量の制限が詳細な機能解明や



倉永 健史

構造決定の壁となるという問題が必ず生じる。

稀少天然物創薬シーズの中でも、小分子と抗体の中間的性質を持つペプチド系天然物は双方の利点を併せ持ち、また欠点を克服し得る次世代の創薬シーズとして大きな注目を集めている。すでに薬剤として利用されている化合物や、創薬リードとして有望なペプチド系天然物の生物活性や薬剤として利用可能な物性等は、各々の化学構造により発揮される。それらのペプチドには D-アミノ酸を含むものが多数存在し、新規に発見されたペプチド系天然物の化学構造決定には構成アミノ酸の絶対立体配置の決定が必須となる。

LC-MS 用高感度アミノ酸光学分割ラベル化剤の開発

ペプチド構成アミノ酸の絶対立体配置決定は、ペプチドの酸加水分解により得られるアミノ酸を光学分割ラベル化剤により誘導体化した後、HPLC や LC-MS で分析し、標品の溶出時間と比較して決定する方法（Marfey 法）が汎用されている¹。しかし、この手法は破壊検査であるため分析を行えば行うほど貴重な試料を失うことになる。また強酸性条件下での加水分解は構成アミノ酸の異性化を生じ、誤った構造決定へと導かれる可能性がある。一方、異性化抑制のために温和な条件下で加水分解を行うと分解産物の収量が低下し、ラベル化アミノ酸の検出が困難となる。それらを踏まえ、異性化を抑制した温和な条件下で大量に分解産物を得ようとするより多くの試料を破壊検査に用いなければならず、特に稀少な創薬リード化合物を扱う研究では何よりサンプルが「もったいない」というジレンマに悩まされる。

化合物を高感度で検出できるラベル化剤があれば、これまで単離・構造決定できなかった微量成分の追跡が可能となる。貴重なサンプルが回収不可能な破壊検査であるアミノ酸分析においても、必要なサンプル量を大幅に低減できる。また温和な加水分解条件によって生成する微量のアミノ酸を検出できれば、酸性条件下での異性化によるペプチド構造決定時の誤りを防ぐことができると考えられる。本稿では、筆者自身が過去に取り組んだ稀少天然物の構造決定時における苦労に基づいた、新規高感度アミノ酸ラベル化剤の開発と応用について記す。

ヤクアミド A（図 1a, **1**）および B（**2**）は、2010 年に深海産海綿 *Ceratopsion* sp. より松永らによって単離・構造決定された、D-アミノ酸および α,β -不飽和アミノ酸を豊富に含むペプチド系天然物である²。浚渫工事における海底土の中に一欠片あっただけらしい海綿自体も稀少で、さらにその海綿から単離された天然物はいずれも 1 mg 程度であった稀少な天然物である。

筆者らは以前、独自に開発した α,β -不飽和アミノ酸含有ペプチド合成法を駆使し、その提唱構造の全合成および構造訂正を報告していた³。その際、ごく微量の天然物しか使用できなかったにも関わらず、考えられる立体異性体全てを化学合成した標品と、天然物試料から異性化を抑制する温和な加水分解条件で得られた超微量部分分解産物の LC-MS 実験により「なぜか」構造修正に成功していた。

後々振り返ってみると、ヤクアミド類がそのC末端に第三級アミン構造を有するため質量分析 (ESI-MS) における感度が上昇していたことがごく微量の試料で構造修正可能であった要因ではないかと思うところがあった。そこで筆者らはヤクアミド類の C 末端構造をモチーフとし、これまで一般的に用いられていたラベル化剤にヤクアミドの構造訂正の際に重要であったと考えられる部分構造を導入した L-FDVDA (図 1b, 7) および L-FDLDA (8) を設計・合成した⁴。

汎用されるアミノ酸ラベル化剤 3 および 4 とともに、7 および 8 によるアミノ酸のラベル化反応 (図 2 にロイシンの例を示す) を行い、各ラベル化アミノ酸の LC-MS 分析を行ったところ、7 および 8 によるラベル化アミノ酸の検出感度が飛躍的に向上した。これまでの投稿論文等で触れていない余談として、図 2b の希釈系列が既製品由来 9a および 9b が有意なピークとして検出されない濃度からスタートしているのは、9c および 9d がそれ以上の濃度では使用した装置の検出上限を超えてしまったためである。なお 9a-d いずれも UV による検出は不可能な濃度であり、また図 2b 中においてチャート後半に有意なピークが観測されていないことは、各試薬の光学純度の高さおよびラベル化反応において分析対象アミノ酸の異性化が生じていないことを示している。

他のアミノ酸についても同様の LC-MS における感度向上が確認され、また光学分割能も良好であることが確認されている。本稿ではアミノ酸用ラベル化剤の紹介に止めるが、他にも糖などの数種の高感度ラベル化剤の開発および応用も行っている⁴。

中性条件下の LC-MS による Marfey 法

独自に開発したアミノ酸用ラベル化剤については、研究展開が早いというよりも筆者自身が執筆依頼をい

ただいてから実際に取りかかるまでが遅かった事情もあり、本稿の締め切り直前となった現在までにさらなる適用範囲の拡大⁵や、いくつかの新規天然物の構造決定への応用⁶にも成功している。以下それらの一部を紹介させていただく。

一般的に LC-MS (ESI) におけるイオン強度は陽イオン検出の方が陰イオン検出より高い傾向があり、また移動相への酸の添加によりさらに強度が高められる場合が多いことが知られている。LC-MS による Marfey 法でもその傾向は顕著であり、9a および 9b などの既製品によるラベル化アミノ酸は酸の添加無しでは大幅に検出感度が低下する (後述の図 3 に実例を示す)。そのため筆者自身もこれまでは LC-MS を用いた Marfey 法では移動相にギ酸を添加して分析を行うことが当たり前のものとなっていた。

一方、構造中に第三級アミンを有する筆者らの試薬によるラベル化アミノ酸は中性条件下でも高い検出感度を示すことが試薬の開発段階においても確認されていた。LC-MS 分析における酸の添加は使用するカラムの劣化を早める。また分析時のノイズを低減させるためにはより高純度・高価な LC-MS グレードの添加剤を用いる必要があるなどの問題点があった。添加剤を加えることなく高感度なアミノ酸光学分割が可能であればそれらの問題を回避可能であり、また単純に測定時の pH が変化することによる光学分割能の向上 (あるいは低下) も期待された。

筆者らはアミノ酸分析においてしばしば行われる移動相への酸の添加を行わない、中性条件下でのアミノ酸分析を行ったところ、期待通りに前述の 9c および 9d は 9a および 9b と比較し大幅に高いイオン強度を示した。また 9a および 9b のイオン強度が酸の添加なしでは著しく低下したのに対し、9c および 9d では強度の低下は観測されなかった (図 3)。中性条件下での 9c および 9d の光学分割能についても、分析を

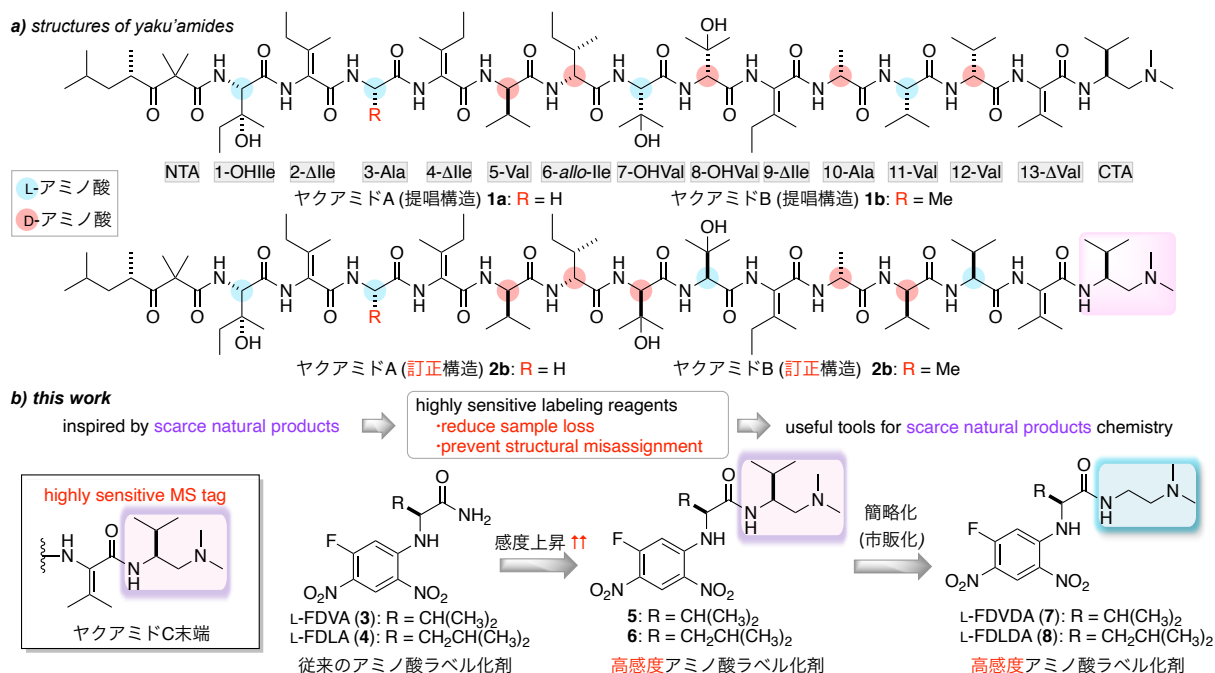


図1 高感度アミノ酸光学分割ラベル化剤の開発経緯

行ったアミノ酸全てにおいて高い光学分割能が確認された。特に汎用される **3** では分離が困難であることが知られているアスパラギンなども筆者らの試薬ではそのラベル化体は分離可能であり、中性条件ではさらに分離能が高まることも確認された⁵ (図 4)。

終わりに

筆者自身が過去に取り組んだ稀少天然物の構造決定時における苦勞に基づいた、LC-MS 用高感度アミノ酸光学分割ラベル化剤の開発とその応用について記した。単純な発想であったが筆者らのアミノ酸分析試薬

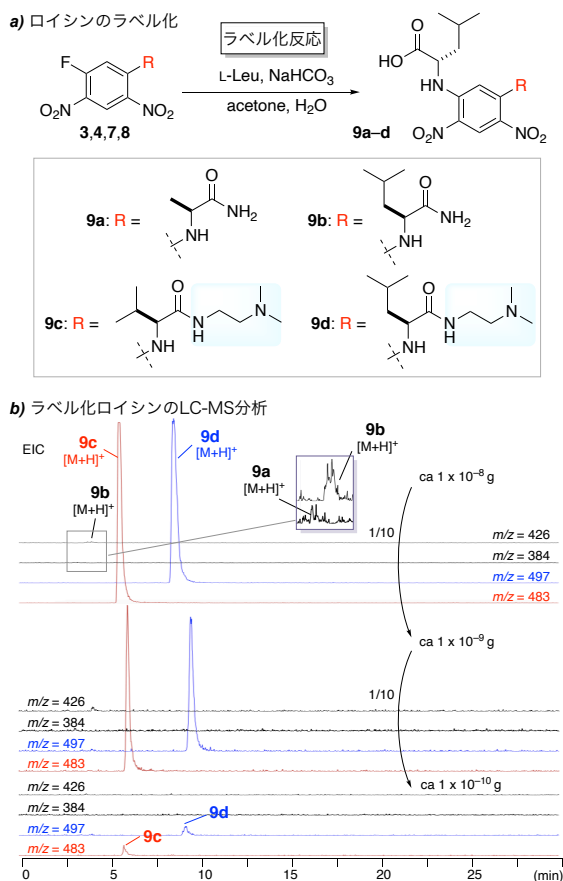


図2 ラベル化ロイシン (**9a-d**) の LC-MS 分析

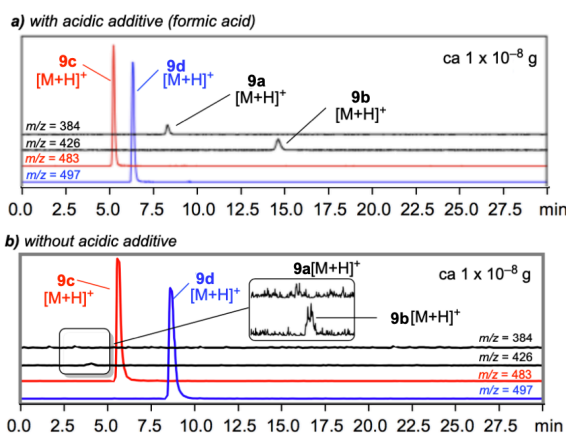


図3 酸性および中性条件下での **9a-d** の LC-MS 分析

は従来品と比較し特筆する欠点がない。また食品中の微量成分分析などの需要の増加も伴い、既製品を置き換えられるものとして大変ありがたいことに一部は早くも市販されている。

謝辞

本研究は京都大学大学院薬学研究科の掛谷秀昭教授ならびにその研究室所属の学生の協力のもとに行われたものである。この場を借りて深謝したい。また京都大学ご在職時に大変貴重な本稿執筆のお誘いをいただいた大石真也先生 (現・京都薬科大学)、矢野義明先生 (現・武庫川女子大学) にも厚く御礼申し上げる。

参考文献

- Marfey, P. Carlsberg Res Commun 1984, 49, 591-596.
- Ueoka, R.; Ise, Y.; Ohtsuka, S.; Okada, S.; Yamori, T.; Matsunaga, S. J Am Chem Soc 2010 132, 17692-17694.
- Kuranaga, T.; Mutoh, H.; Sesoko, Y.; Goto, T.; Matsunaga, S.; Inoue, M. J Am Chem Soc 2015, 137, 9443-9451.
- Kuranaga, T.; Minote, M.; Morimoto, R.; Pan, C.; Ogawa, H.; Kakeya, H. ACS Chem Biol 2020, 15, 2499-2506.
- Morimoto, R.; Matsumoto, T.; Minote, M.; Yanagisawa, M.; Yamada, R.; Kuranaga, T.; Kakeya, H. Chem Pharm Bull 2021, 69, 265-270.
- Pan, C.; Kuranaga, T.; Cao, X.; Suzuki, T.; Dohmae, N.; Shinzato, N.; Onaka, H.; Kakeya, H. J Org Chem 2021, 86, 1843-1849.

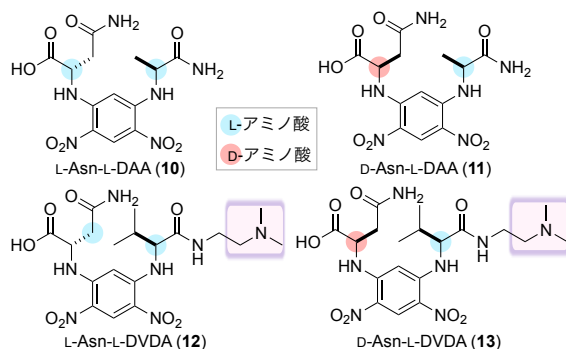
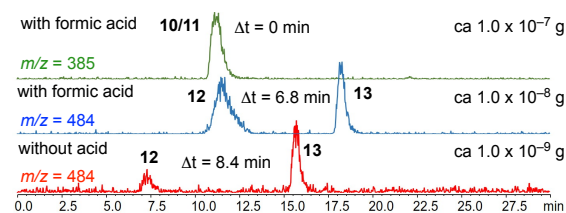


図4 酸性および中性条件下での **10-13** の LC-MS 分析

ポスト抗体医薬：免疫チェックポイントを制御するヘリックス-ループ-ヘリックスペプチド—マイクロ抗体—

1. はじめに

この度は、ペプチドニューズレターへの執筆の機会を頂きました編集委員の矢野義明先生に厚く感謝申し上げます。私は、大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻生命化学研究室（藤井郁雄教授主催）におきまして、ヘリックス-ループ-ヘリックス（HLH）構造をもつ立体構造規制ペプチド「マイクロ抗体」を土台分子とした分子標的医薬を創出するため、タンパク質-タンパク質相互作用（protein-protein interaction: PPI）特異的阻害剤の創出研究に従事して参りました。本稿では、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）を制御する HLH ペプチドについてご紹介致します。



藤原 大佑

我々はこれまでに、PPI 阻害活性をもつ、抗体様機能物質の立体構造規制ペプチド「マイクロ抗体」（分子量：約 4000）を創出してきました¹。進化分子工学の代表的手法である、ファージ表層提示法を用いてライブラリーを作製し、顆粒球コロニー形成刺激因子（G-CSF-R）受容体、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、IgG Fc ドメイン、プロテインキナーゼなどに対する分子標的 HLH ペプチドを獲得してきました²⁻⁴。さらに、p53 由来の結合エピトープを HLH ペプチドにグラフティングし、細胞膜透過性を付与することで、細胞内 PPI である p53-HDM2 相互作用を阻害するマイクロ抗体 cHLHp53-R の創出にも成功しております⁵。中でも、本稿では、酵母表層提示法を用いたライブラリー・スクリーニングによって得た、免疫チェックポイントを制御して免疫細胞を活性化できるマイクロ抗体 ERY2-4 について紹介します⁶。

2. 免疫チェックポイントを制御するマイクロ抗体 ERY2-4

我々は、細胞傷害性 T リンパ球抗原 4（CTLA-4）と抗原提示細胞上の B7 との相互作用を阻害し、免疫細胞を活性化させるマイクロ抗体を創出しました（図 1）。CTLA-4 は、T 細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体の 1 つで、がん細胞は CTLA-4 経路を利用し、免疫応答の進行を抑制します^{7,8}。樹状細胞から腫瘍抗原の提示を受けて活性化した T 細胞表面には、CTLA-4 が発現し、樹状細胞 B7 に結合することで、T 細胞の活性化が抑制されます。抗 CTLA-4 分子標的ペプチドは、CTLA-4 に結合することで B7 との結合を阻害し、T 細胞活性化を増強・持続し、活性化した抗腫瘍 T 細胞を誘導することが期待されました。本研究では、酵母表層提示マイクロ抗体ライブラリーを作製して、組み換えタンパク質 CTLA-4 に対するスクリーニングを行いました。さらに、得られたペプチドの親和性成熟（Affinity Maturation）を行いました。親和性成熟とは、タンパク質やペプチドに任意の変異を導入させて、標的分子結合活性を向上させる技術です。親和性成熟の結果、CTLA-4 に対して K_D 値 196 nM で結合する HLH ペプチド ERY2-4 を得ました。ERY2-4 は、CTLA-4/B7 相互作用を選択的に阻害し、さらに免疫細胞を活性化しました。用いた酵母表層提示マイクロ抗体ライブラリーと CTLA-4 に対するスクリーニングについて説明致します。さらに、得られたマイクロ抗体 ERY2-4 が示す生物活性について紹介します。

3. 酵母表層提示マイクロ抗体ライブラリーを用いた CTLA-4 結合性 HLH ペプチドの獲得

本研究では、2 種のマイクロ抗体ライブラリー（ Δ PTA-12RC-1 と Δ PTA-12RC-2）を作製してライブラリー・スクリーニングに用いました（図 2）。マイクロ抗体は、HLH 構造を基盤とする、立体構造規制ペプチドです。本稿で用いた酵母表層提示マイクロ抗体ライブラリーは、HLH ペプチドをさらにジスルフィド結合で分子内環化させた、環状化 HLH（cHLH）ペプチド YT1-S を土台分子としています³。図 2 に示す通り、一つの cHLH ペプチド中の、 α -ヘリックス構造をもつ 2 箇所の領域中のアミノ酸をそれぞれランダム化しています。

図 2 に示すマイクロ抗体ライブラリー Δ PTA-12RC-1 と Δ PTA-12RC-2 の混合溶液を用いてライブラリー・スクリーニングを行いました。IgG Fc ドメインとの融合タンパク質であるヒト CTLA-4（h-CTLA-4-Ig）を標的分子としてスクリーニングを行いました。

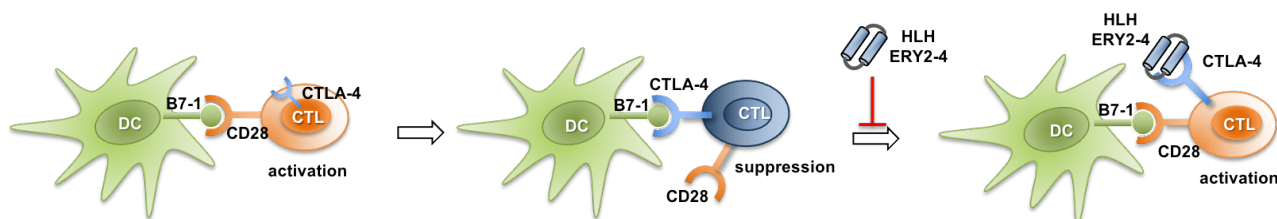


図 1 CTLA-4/B7 相互作用阻害 HLH ペプチド ERY2-4 による免疫細胞の活性化

まず、Magnetic-activated cell sorting (MACS) によって、ビーズに固定したビオチン化 h-CTLA-4-Ig に結合する酵母クローンを回収して増幅しました。さらに、BD FACSria™ III u セルソーターを用いて fluorescence-activated cell sorting (FACS) によって、h-CTLA-4 結合性の酵母クローンをソーティングしました。得られた酵母クローンがコードする HLH ペプチドの塩基配列を確認し、獲得したペプチドのアミノ酸配列を推定しました。15 種のクローンについて DNA 配列解析をしたところ、4 種の異なったアミノ酸配列に収束したことが明らかとなりました。得られたペプチドを、固相法で化学的に合成しました。Surface plasmon resonance (SPR) 法による結合活性測定を行ったところ、ペプチド Y-2 の K_D 値は $6.4 \mu\text{M}$ でした。Y-2 は、CTLA-4 に選択的に結合し、また、CTLA-4/B7 相互作用を阻害することが推定されたため、こちらを土台分子として親和性成熟を行うことにしました。

クローン Y2 の配列をコードするプラスミドを鋳型としてエラープローン polymerase chain reaction (PCR) を行い、Y2 を土台分子とした酵母表面提示 cHLH ペプチド・ライブラリーを作製しました (ペプチドあたり 1-3 個のアミノ酸変異確率)。先と同様条件で h-CTLA-4-Ig に対するライブラリー・スクリーニングを実施したところ、3 種のペプチド ERY2-1, -4, -6 を得ました。これらのペプチドを固相法により化学的に合成し、CD スペクトル測定の結果、これらの合成ペプチドが、 α -ヘリックス構造をもつことを確認しました。さらに SPR 法を用いて h-CTLA-4-Ig に対する結合活性を測定したところ、ペプチド ERY2-4 の結合活性は (K_D 値 196.8 nM)、

土台分子 Y-2 と比較して約 75 倍上昇しており、親和性成熟させることに成功しました (図 2)。また標的分子 h-CTLA-4-Ig に対する特異性も確認しました⁶。h-CTLA-4-Ig 結合性 cHLH ペプチド ERY2-1, ERY2-4, ERY2-6 について、CTLA-4/B7-1 相互作用阻害活性を評価しました。まず、SPR 法を用いて、固定化 B7-1 と h-CTLA-4-Ig との相互作用阻害活性を測定したところ、ERY2-1, ERY2-4, ERY2-6 の IC_{50} 値はそれぞれ、 $0.92 \mu\text{M}$, $1.1 \mu\text{M}$, $1.7 \mu\text{M}$ でした。もっとも K_D 値の小さかった ERY2-4 の生物活性を調べることとしました。

4. マイクロ抗体 ERY2-4: 免疫細胞の活性化

ヒト血液由来の樹状細胞上に提示された B7 と、組換えタンパク質 h-CTLA-4-Ig との相互作用阻害活性を測定しました (図 3)。樹状細胞上の細胞表面に結合した h-CTLA-4-Ig を、フローサイトメーターを用いて、抗ヒト IgG Fc-FITC により検出しました。測定の結果、樹状細胞上の B7 と h-CTLA-4-Ig との相互作用阻害活性 (IC_{50}) は、 632 nM でした。ERY2-4 の CTLA-4 に対する特異性が高いことを確認できていたことから、CTLA-4/B7 相互作用選択的な阻害によって、ERY2-4 が免疫細胞の活性化することが期待されました。そこで最後に、ヒト血液由来の混合リンパ球培養における同種間 (アロジェネニック) リンパ球増殖活性測定 (mixed lymphocyte reaction (MLR) アッセイ) を行いました。大変興味深いことに、ERY2-4 を加えることで、免疫細胞活性化特有の現象であるクラスターが形成されたことを形態学的に確認しました。さらに、チミジン取り込み法によって

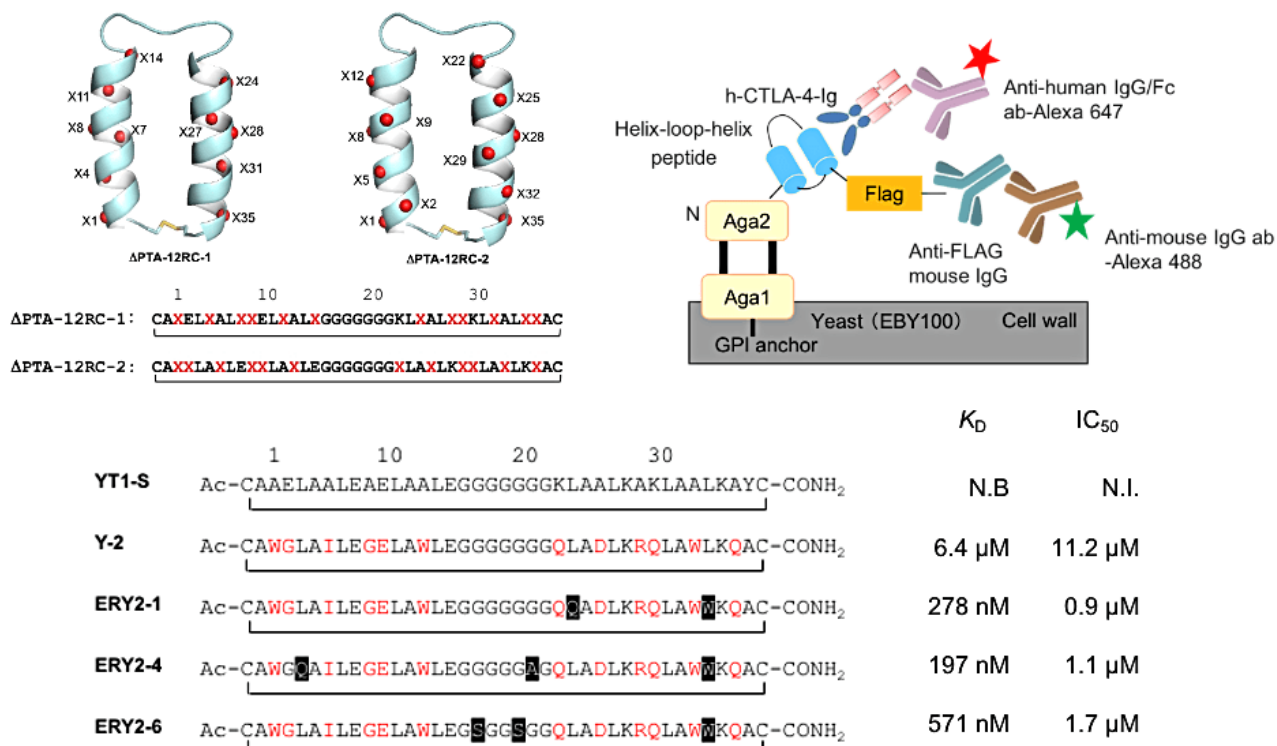


図2 酵母表面提示マイクロ抗体・ライブラリー: APTA-12RC-1 および APTA-12RC-2 と (上図), 獲得した CTLA-4 結合性 HLH ペプチド (下図)

免疫細胞が増殖したことを確認しました。すなわち、マイクロ抗体 ERY2-4 は、CTLA-4/B7-1 相互作用を阻害して免疫細胞を活性化させることを明らかにしました。

5. おわりに

ペプチド ERY2-4 を今後さらに親和性成熟させることで、CTLA-4 結合活性ならびに、CTLA-4-B7 相互作用阻害活性の高いマイクロ抗体が得られると期待できます。これによって、今後がん細胞増殖を止める抗がん活性をもつマイクロ抗体の創出が期待できます。加えて言えば、マイクロ抗体のコンセプトに合致する、強固な二次構造をもち生体内でも安定な立体構造規制ペプチドであれば、HLH ペプチドに限らずいずれの構造であっても、ポスト抗体医薬品としての開発が期待できます。本研究事例をきっかけとして、多種多様な立体構造を土台とする分子標的ペプチドが創出され、立体構造規制ペプチドを分子基盤とする、中分子医薬品の開発がより一層発展すれば幸いです。

謝辞

本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 杉浦喜久弥教授と和歌山県立医科大学の井上徳光教授

との共同研究の成果です。両教授に深く感謝申し上げます。また大阪府立大学大学院理学系研究科藤井郁雄教授、道上雅孝助教、ならびに、職員、学生の皆様に感謝申し上げます。また、本研究にあたり、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）の課題番号 19am0101097j0003 の支援を受けました。

文献

1. Fujiwara, D.; Fujii, I. *Curr Protoc Chem Biol* 2013, 5, 171-194.
2. Mchigami, M.; Takahashi, K.; Yamashita, H.; Ye, Z.; Nakase, I.; I. Fujii. *PLoS One* 16, 2021, e0247045.
3. Kawabata, K.; Nagai, H.; Konishi, N.; Fujiwara, D.; Sasaki, R.; Ichikawa, T.; Fujii, I. *Bioorg Med Chem* 2014, 22, 1845-1849.
4. Fujiwara, D.; Ye, Z.; Gouda, M.; Yokota, K.; Tsumuraya, T.; Fujii, I. *Bioorg Med Chem Lett* 2010, 20, 1776-1778.
5. Fujiwara, D.; Kitada, H.; Oguri, M.; Nishihara, T.; Michigami, M.; Shiraishi, K.; Yuba, E.; Nakase, I.; Im, H.; Cho, S.; Joung, J.Y.; Ko-

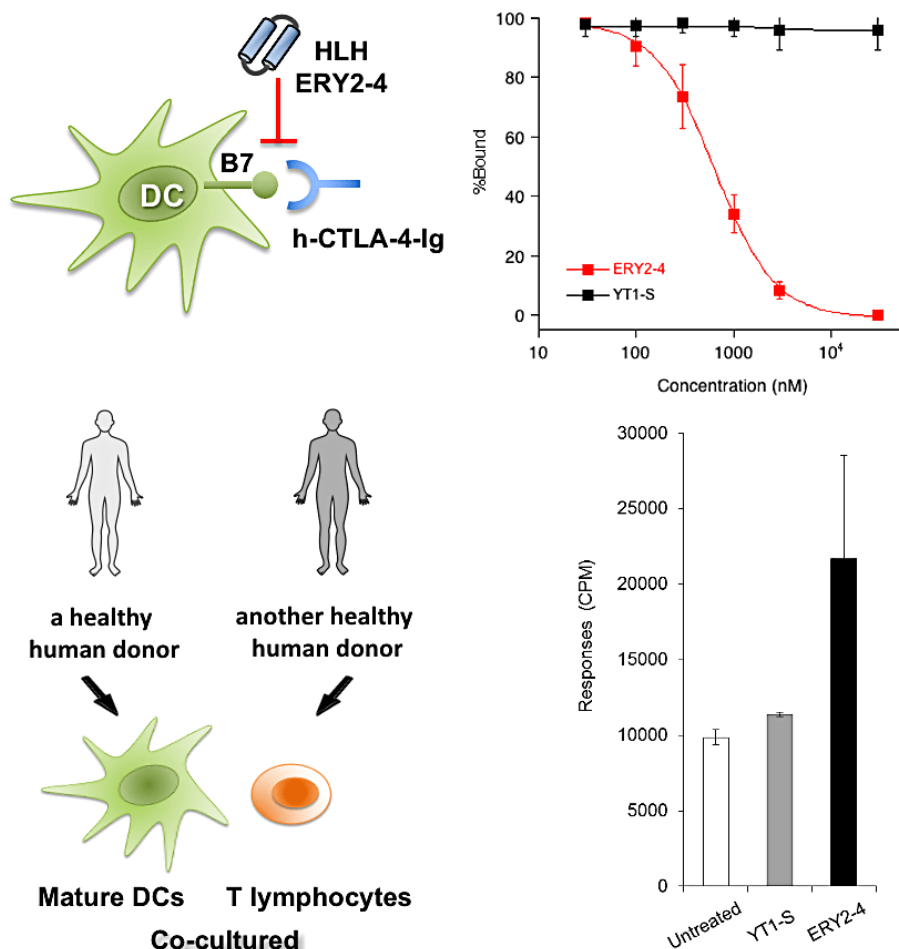


図3 HLH ペプチド ERY2-4 の生物活性。樹状細胞（DC）に提示された B7 と組換え体 CTLA-4 との相互作用阻害活性測定（上図）と、MLR アッセイにおける免疫細胞活性化試験（下図）

- dama, S.; Kono, K.; Ham, S.; Fujii, I. Angew Chem Int Ed 2016, 55, 10612–10615.
6. Ramanayake Mudiyansele T. M. R.; Michigami, M.; Ye, Z.; Uyeda, A.; Inoue, N.; Sugiura, K.; Fujii, I.; Fujiwara, D. ACS Chem Biol 2020, 15, 360–368.
 7. Hendriks, L.; Besse, B. Nature, 2018, 558, 376–377.
 8. Ramagopal, U. A.; Liu, W.; Garrett-Thomson, S. C.; Bonanno, J. B.; Yan, Q.; Srinivasan, M.; Wong, S. C.; Bell, A.; Mankikar, S.; Rangan, V. S.; Deshpande, S.; Korman, A. J.; Almo, S. C. Proc Natl Acad Sci USA 2017, 114, E4223–E4232.

ふじわら だいすけ
大阪府立大学 大学院理学系研究科
生物科学専攻
fujiwara@b.s.osakafu-u.ac.jp

2021 年度行事予定

2021 年 7 月

Peptide Newsletter Japan No. 121 発行

2021 年 8 月 9 日 (月) ~ 10 日 (火)

第 53 回若手ペプチド夏の勉強会 (オンライン)

世話人：門之園 哲哉 (東工大),
三木 卓幸 (東工大),
小松 徹 (東京大)

2021 年 10 月

Peptide Newsletter Japan No. 122 発行

2021 年 10 月 (予定)

第 108 回理事会・第 40 回評議会合同会議
(オンライン)

2021 年 10 月 20 日 (水) ~ 22 日 (金)

第 58 回ペプチド討論会 (オンライン)

世話人：林 良雄 (東京薬科大)

2021 年 10 月 21 日 (木)

2021 年度日本ペプチド学会通常総会 (オンライン)

2021 年 10 月 23 日 (土)

日本ペプチド学会市民フォーラム 2021 (中止)

2021 年 11 月 (予定)

第 17 期評議員選挙公告

2021 年 12 月 (予定)

第 17 期評議員選挙開票

2022 年 1 月

Peptide Newsletter Japan No. 123 発行

2022 年 1 月 (予定)

第 109 回理事会

編集後記

ペプチドニュースレター 121 号をお届けします。本号では、若手の先生方に最近のご研究内容につきまして紹介記事のご執筆をお願いしました。お忙しい中ご寄稿を頂きました、河野先生、倉永先生、藤原先生、ありがとうございました。コロナウイルス関連では引き続き予断を許さない状況ですが、ワクチン接種が進み好転の兆しも出てきているのでしょうか。

暑い日が続いて参りますが、ペプチド学会に関連する皆様がお健やかに過ごしていただけますようお願いいたします。

本ニュースレターについての読者アンケートを行っております。ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

121 号アンケートフォーム URL :

<https://forms.gle/z3wjVZ6KPdYLhEhJ9>

(編集委員：矢野 義明)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-0015 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

発行日：2021 年 7 月 30 日

編集委員

玉村 啓和 (担当理事)

(東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

TEL 03-5280-8036, FAX 03-5280-8039

E-mail : tamamura.mr@tmd.ac.jp

巢山 慶太郎 (九州大学 基幹教育院)

TEL 092-802-5849

E-mail : suyama@artsci.kyushu-u.ac.jp

矢野 義明 (武庫川女子大学 薬学部)

TEL 0798-45-9961

E-mail : yyano@mukogawa-u.ac.jp

吉矢 拓 (株式会社ペプチド研究所)

TEL 072-643-4411, FAX 072-643-4422

E-mail : t.yoshiya@peptide.co.jp

児島 千恵 (大阪府立大学 大学院工学研究科)

TEL 072-254-8190

E-mail : kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

(本号編集担当：矢野 義明)