研究シーズ探索プログラム　研究課題別評価書

１．研究課題名

化学拡張進化分子工学による機能性分子の創成

２．研究代表者

伊藤　嘉浩（独立行政法人理化学研究所基幹研究所　伊藤ナノ医工学研究室　主任研究員）

３．研究シーズ探索成果の概要

　生物の生存戦略である「進化」を模倣する進化分子工学を化学的に拡張することで新しい「バイオものづくり」の方法論を確立し、この方法で様々な新しい原理に基づく機能性分子の創成が可能となることを示した。具体的には、阻害剤をモチーフにしたペプチドアプタマーにより阻害効果を高める創薬原理と、蛍光分子をモチーフとして標的分子に結合するだけで蛍光を変化できるセンシングできるプローブ構築原理を、実証することができた。可能性の実証という観点からは目論見通りの結果が得られた。分子認識機能をもつ分子創成原理として、将来的に推進すべき研究シーズであることを確認できた。

４．研究シーズ探索のねらい

生物の生存戦略である「進化」を模倣する進化分子工学を化学的に拡張することで新しい「バイオものづくり」の方法論を確立し、この方法で様々な新しい原理に基づく機能性分子の創成が可能となることを示す。具体的には、阻害剤をモチーフにしたペプチドアプタマーにより阻害効果や選択性を高める創薬原理と、蛍光分子をモチーフとして標的分子に結合するだけで蛍光を変化できるセンシングできるプローブ構築原理を、実証する。

５．研究シーズ探索の方法と成果

５．１ 方法

　本研究課題では、化学拡張進化分子工学（リボソームディスプレイ法）により、阻害剤をモチーフとして内蔵したペプチドアプタマーと蛍光分子をプローブとして内蔵したペプチドアプタマーの取得を行った。

　まず、タンパク質阻害剤をアミノフェニルアラニンに導入し、tRNA を調製した。これをリボソーム・ディスプレイによる進化分子工学へ用いることで、タンパク質（ここではサイクリン依存性キナーゼ2、CDK-2）に対する阻害剤アプタマーの選別を行った。具体的には、ランダム配列とストップコドンを含む DNA 鋳型を調製し、無細胞翻訳系によりリボソーム・ディスプレイ（mRNA－リボソーム－ペプチド複合体）を作成する際に、阻害剤結合 tRNA を混合して、阻害剤を組み込んだペプチドをディスプレイ（提示）するリボソーム複合体を調製した。ここに標的タンパク質を加え、相互作用させたあとに、阻害剤を用いてリガンド溶出を行った。得られたリボソーム複合体を分解し、mRNA だけを取り出し、これを RT-PCR で増幅した後、再び無細胞翻訳系を用いて同様な操作を行った。この一連の過程を5回繰り返し、最後に得られた mRNA をクローニングし、配列を決定した。

５．２ 成果

選択された配列のなかで最もクローン数が多くなった配列を DNA 鋳型として翻訳液を調製し、CDK-2 の阻害活性を測定した。合成したペプチドによる測定の前段階として、無細胞翻訳系でペプチド調製を行い、その阻害活性を評価したところ、添加量の増加に伴い、酵素活性を低下させる傾向が得られた（図1）。

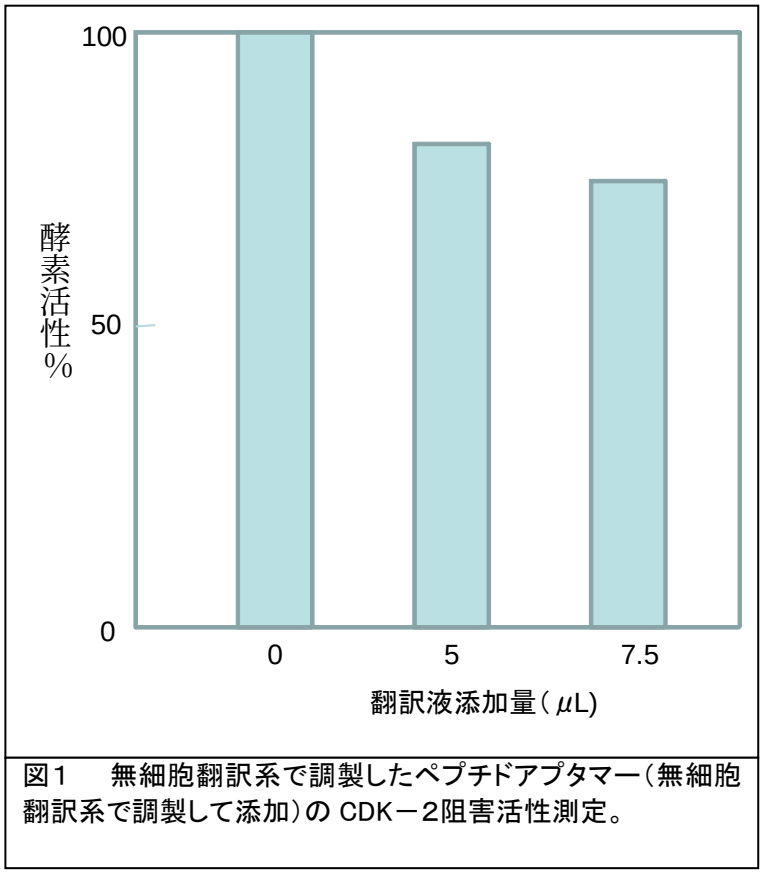

図1　無細胞翻訳系で調製したペプチドアプタマー（無細胞翻訳系で調製して添加）の CDK－2阻害活性測定。

この現象は、図2に示すように阻害剤アプタマーを得ることにより相互作用点を増加させることができ、阻害剤よりも高い活性の阻害剤を得られる可能性を示すものと考えられた。

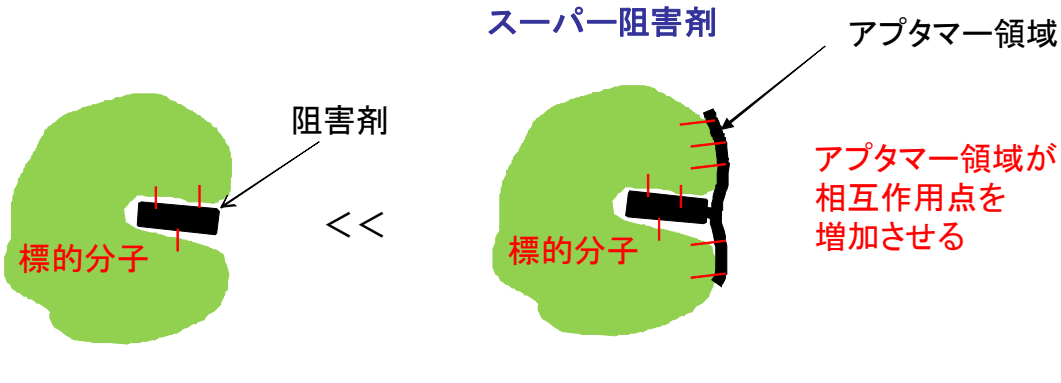

図2　　阻害剤にアプタマー領域を付加することでスーパー活性を付与できる原理。

現在、この翻訳系で得られた結果が有機合成したペプチドアプタマーでも得られるかの検証を行っており、その結果がまとまり次第、論文発表を行う予定をしている。

一方、蛍光分子組み込み型ペプチドアプタマーについては、タンパク質を認識して蛍光が変化する配列が得られ、有機合成したペプチドアプタマーを用いて蛍光強度の顕著な変化も観測され、当初の目的を達成でき、現在、さらに詳しい解析を行っている。

6. 自己評価

進化分子工学、試験管内進化法と言われる方法が 1990 年前後に提唱され、それに関わり約 20 年をへた。この方法そのものは分子生物学や生物工学に携わる研究者が中心であったが、化学者として有機合成した化合物を組み入れることを一貫して狙ってきた。当初、核酸アプタマーについて行ってきたが、近年はより分子構造として多様性が高く、実用化が期待できるペプチドアプタマーに移り、今回初めて有機合成した機能性分子の組み込みを行った。このような方法論で、分子認識に基づく機能性分子を探索し合成した例は世界的に例がない。しかし、有機合成とバイオテクノロジーの両方の技術が必要なため実験者には苦労が多い。特に試験管内進化法の操作そのものは、機械化も考えるほど単調な作業の繰り返しとなるが、それだけに実験者にとっては向き不向きが顕著に思える。新しい融合研究分野で、何をするにも手探りで、結果がでるのにも時間も要し、共同研究者だけでなく自らも不安にかられながら、きっとこの技術が確立できれば新たな地平線が現れると信じて進むしかないという状況で、今回やっとその萌芽が見え始めた。

ただ、まだ論文発表までには至らず、公開できる結果も少ない。得られたペプチドアプタマーについて早急に詳細な解析を行い、論文発表を行う予定をしている。

7. PO の見解

本研究は抗体医薬と分子標的医薬の融合により、阻害剤モチーフ含有ペプチドアプタマーを開発するもので、DNA鋳型に阻害剤担持アミノ酸を付加、転写・反応をさせ、リボソーム・ディスプレイにより標的分子に結合するものを識別し、そのmRNAをDNA鋳型に戻すことで、進化分子工学的に目的とする

薬剤を創り出そうとするものである。標的酵素CDK－2に対する阻害剤を組み込んだペプチドアプタマー候補を得ることができた。
生体分子工学と有機合成化学の融合を目指したものとして評価されるが、化学的拡張進化分子工学として一般化される原理、技術、手法として確立までには至っていない。また、ペプチドアプタマーから薬剤設計ができることが創薬の発展には必須であり、その方法論が今回のペプチドアプタマー候補探索の手法に加えられれば、非常に有意義なものとなるであろう。

８．研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

Shuta Hara, Mingzhe Liu, Wei Wang, Muye Xu, Zha Li, and Yoshihiro Ito, “Stabilized ribosome display for *in vitro* selection”, in “Ribosome Display and Related Display Technologies: Methods and Protocols”, “Methods in Molecular Biology”, edited by Julie Douthwaite and Ron Jackson, Humana Press, Cambridge, in press, 2011

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（3）口頭発表

①学会
国内　1 件,　海外(国際)　1 件

1. Wei Wang, Shuta Hara, Akira Wada, Mingzhe Liu, Toshiro Aigaki, Yoshihiro Ito: “In vitro selection of peptide aptamer binding to Vitamin B12”, 5th International Peptide Symposium, Kyoto, Dec. 2010

2. 王偉、原秀太、和田章、劉明哲、相垣敏郎、伊藤嘉浩：“ビタミン B12 結合性ペプチドアプタマーの試験管内選択”、日本化学会第 4 回関東支部大会、つくば、8 月（2010）

②その他
国内　0 件,　海外　0 件

（4）その他の成果（受賞、著書、招待講演、特記事項等）

該当なし