

京都大学大学院
農学研究科応用生命科学専攻

Studies on the novel bioactive peptide screening systems
for G-protein coupled receptors and neuraminidase

(G タンパク質共役受容体およびノイラミニダーゼを標的とした
生理活性ペプチドの新規機能的探索法に関する研究)

重盛 智大

専門種目：生体高分子化学

指導教員：植田 充美 教授

2015 年 1 月

緒言

これまでに約 1800 の医薬品が上市され、疾患の予防並びに治療を通して人類の福祉に貢献してきた。しかしながら近年では医薬品の研究開発効率の低下、すなわち一品目当たり開発コストの上昇が課題となっている。従来、低分子化合物を基礎とした医薬品開発が主流であったが、大腸菌を用いたヒトインスリン生産に代表される遺伝子組換え技術の登場に伴い、モノクローナル抗体などの高分子タンパク質をはじめとしたバイオ医薬品が開発されてきている。一方で、ペプチドはその中間的大きさから低分子化合物および抗体の長所を兼ね備える潜在性を有し、新しい創薬を可能にすると考えられる (Table 1)。

Table 1 医薬品としてのペプチドの潜在的特質

	低分子医薬 (0.5 kDa 付近)	ペプチド (~5 kDa)	抗体医薬 (~150 kDa)
分子設計	多様な合成展開	アミノ酸配列の組合せ	アミノ酸配列の組合せ
安全性	複数項目のケア	抗原性	抗原性
製造コスト	安価	中程度	高価
タンパク質間相互作用	困難	可能	容易
細胞内標的	容易	可能	困難
体内安定性	中程度	低い	高い

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は 7 回膜貫通型細胞膜受容体であり、ヒトゲノム上には約 800 種類の存在が推測されている。GPCR は生理活性物質等の外部刺激の受容を介して様々な生理機能調節および病態発症に関与しており、現在使用されている医薬品の約 3 割がこれを標的としている。リガンドや生理機能が不明のオーファン受容体は未だ 100 種類以上あると考えられており、今後も重要な創薬標的と考えられる。

ところで近年、世界的規模ではウイルス感染症も大きな問題となっている。中でも、インフルエンザウイルスはブタやトリを介してヒトに対してパンデミックを引き起こしている。本ウイルスの増殖および拡大には膜タンパク質の糖鎖切断酵素であるノイラミニダーゼが重要である。これの阻害剤タミフルは最も幅広く処方されているが、耐性ウイルスの出現が問題となっており、新規の阻害剤および探索手法が求められている。

GPCR や酵素に対する生理活性ペプチドの探索にはこれまで、ファージディスプレイ技術が幅広く利用されてきたが、本手法は標的との結合のみを指標とし、取得されたペプチドが機能的活性を有するかは不明である。さらに、ペプチドはファージ粒子上に拘束された状態でスクリーニングされるため遊離ペプチドが同様の活性を持つかは不明であることが多い。そこで、本研究では各種ペプチドを分泌するように改変した酵母を用い、GPCR およびノイラミニダーゼを標的とした新規生理活性ペプチドの機能的スクリーニング手法の構築を目的とした。

1. 血糖調節に関わる GLP1 受容体を標的とした酵母分泌ペプチドの機能的アッセイ系構築

Glucagon-like peptide-1 (GLP1) は 30 アミノ酸で構成されるペプチドホルモンであり、食物摂取に伴い小腸 L 細胞から血液中へ分泌され、膵β細胞や中枢組織に発現している GPCR である GLP1 受容体 (GLP1R) の活性化を介してインスリン分泌促進による血糖低下および食欲抑制に関わる (Fig. 1)。本研究では GLP1R アゴニストである exendin-4 (Ex4) を酵母に分泌生産させ、GLP1R 発現培養細胞によって機能的に受容させることで、化学合成を必要としない遊離ペプチドの機能的活性検出

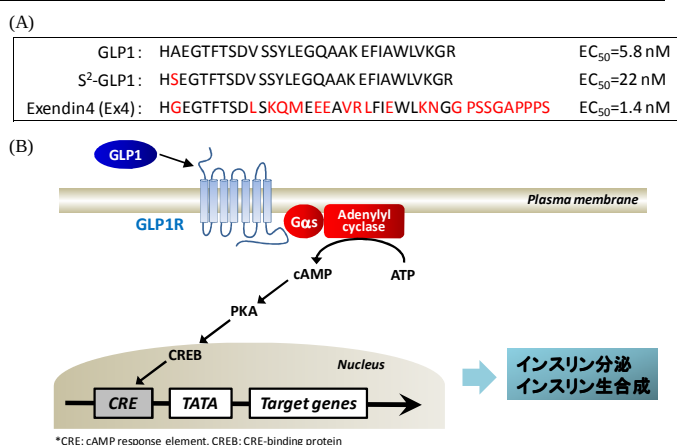


Fig. 1 GLP1 アゴニストのアミノ酸配列(A)および GLP1R シグナリング(B)

システムの構築を試みた。まず、酵母 α -factor 分泌シグナル遺伝子を 5'末端に配置した Ex4 遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 に導入し、Ex4 分泌酵母を作製した。他方、GLP1R 遺伝子の CHO 細胞への導入により GLP1R 発現細胞を作製し、受容体活性化を反映する cAMP が合成 Ex4 添加により用量依存的に産生されることを ELISA により確認した。

次に、GLP1R 活性化を最も感度良く検出できる培地条件を検討した。酵母用合成デキストロース (SDC) 培地もしくは哺乳類用ダルベッコ改変培地 (DMEM) が入った 6-well plate にてコントロールペプチドもしくは Ex4 を分泌する酵母を培養し、その培養上清を GLP1R 細胞に添加した後、cAMP を測定することで GLP1R 活性化を評価した。その結果、DMEM 培地は酵母の増殖を著しく低下させるが、GLP1R を強く活性化できることが判明した (Fig. 2)。

次に、本活性検出システムを 96-well plate を用いたハイスルー

ット化するため、GLP1R アッセイに必要な酵母数を検討すると同時に、その必要酵母数に到達するための培養時間を評価した。その結果、酵母を SDC 培地にて 48h 培養することで活性検出に十分な 10^6 細胞に到達することを確認した。

以上の検討から、ペプチド分泌酵母の増殖には SDC 培地が最適であり、GLP1R アッセイには DMEM 培地が最適であると判断し、次のような一連の活性検出システムを設定した。すなわち、①ペプチド分泌用プラスミドで形質転換した酵母コロニーを SDC 培地が入った 96-well plate へ植菌・培養し、②DMEM 培地へと置換・培養し、③培養上清を GLP1R 細胞に添加し ELISA により受容体活性化を評価するというシステムである (Fig. 3 A)。

本システムの有用性を実証するために、Ex4 分泌酵母に加えて GLP1 および A2S 置換した S^2 -GLP1 分泌酵母を作製し、分泌ペプチドの GLP1R 活性化能を評価した。その結果、Ex4 分泌酵母ではコントロール酵母に比べて 59 倍の活性化が観察されたものの、GLP1 や S^2 -GLP1 分泌酵母ではそれぞれ 5.8 倍および 1.7 倍と、 EC_{50} 値を考慮すると低い活性化に留まった。ここで、ペプチドタグとして一般的に使用される FLAG 配列 (DYKDDDDK) を各 GLP1 アゴニストの C 末端に付加し分泌生産させたところ、コントロール酵母に比べて GLP1FLAG および S^2 -GLP1FLAG 分泌酵母はそれぞれ 46 倍および 21 倍と、FLAG 不含ペプチドに比べて約 10 倍の活性上昇を示した (Fig. 3 B)。他のペプチドホルモンでも同じような結果が得られていることから、活性検出感度を高めるための手段として FLAG タグを配置する手法は一般化できる可能性が示唆された。

最後に、本活性検出システムのさらなる応用として、Ex4 分泌酵母のモデルスクリーニングを実施した (Fig. 4 A)。コントロール酵母および Ex4 酵母の酵母数が 9:1 となるように 96-well plate へ播種し、GLP1R 活性化を指標にして Ex4 酵母が存在する well の特定を試みた。その結果、播種した 16well のうち 3well で GLP1R 活性を検出した (Fig. 4 B)。さらに、GLP1R 活性が陽性および陰性であった well 中の酵母を固形培地に播種し、コロニーとして

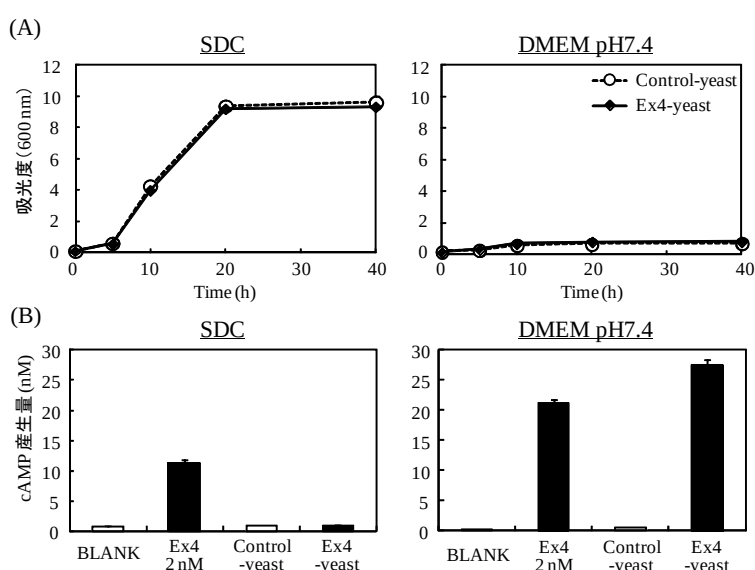


Fig. 2 各種培地で培養した酵母の増殖 (A) および培養上清の GLP1R 活性化能 (B)

単離した。これら各コロニーについてダイレクト PCR を実施し、分泌ペプチドに相当する遺伝子型をアガロース電気泳動のバンドサイズから判定した。その結果、陰性 well の酵母コロニーからは Ex4 遺伝子は全く検出されなかった一方で、陽性 well では約 24% のコロニーが Ex4 遺伝子を有する酵母であることを確認した (Fig. 4 C)。

以上から、本研究にて確立したペプチド分泌酵母および GPCR 発現哺乳類細胞で構成される機能的アッセイ系は、精製や濃縮・化学合成を必要とせずに遊離ペプチドの活性評価が可能であり、また、新規活性ペプチドの探索手法としても有用であることが示唆された。

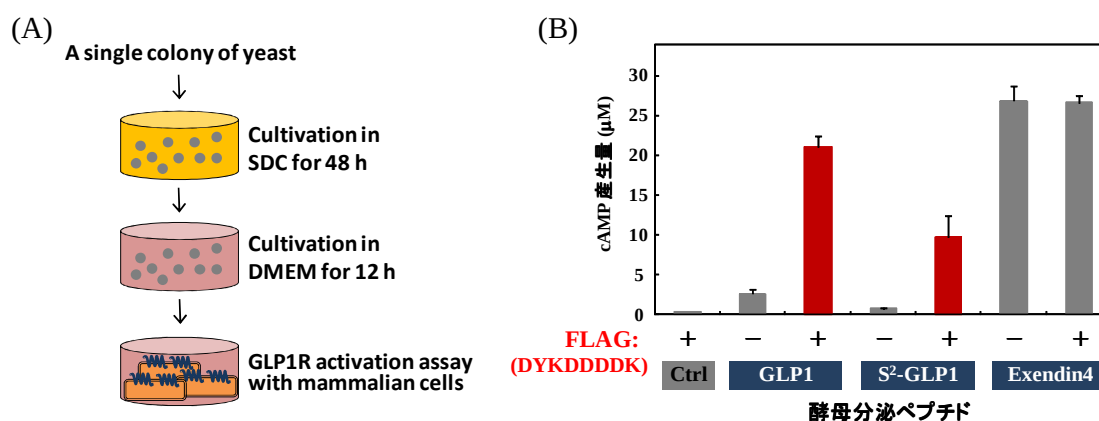


Fig. 3 酵母分泌 GLP1R アゴニストの直接活性検出

(A) 活性検出システムの作業手順, (B) 酵母分泌 GLP1R アゴニストの活性検出

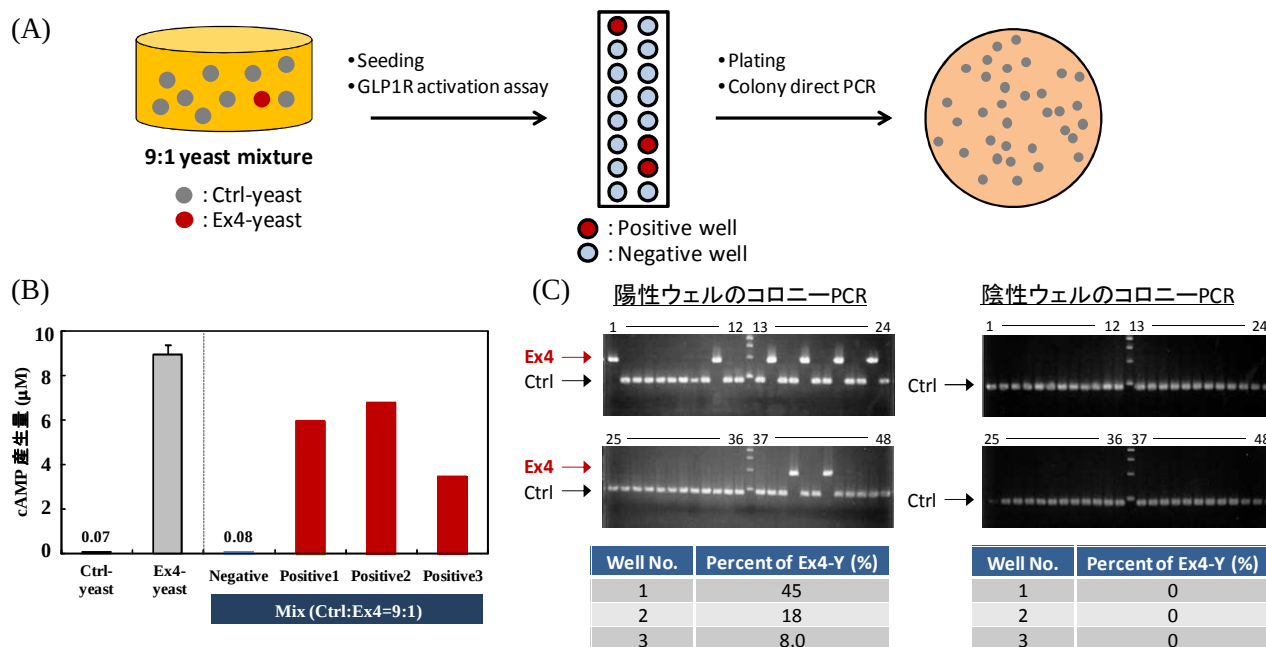


Fig. 4 酵母分泌ペプチド直接活性検出システムを用いた Ex4 分泌酵母のモデルスクリーニング

(A) 試験の流れ, (B) GLP1R 活性化を指標にしたスクリーニング

(C) 陽性および陰性ウェル酵母のコロニーPCR

2. 酵母ペプチド分泌系を用いたランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニング

これまでの活性検出は ELISA にて行っていたが、本手法は細胞破碎や洗浄操作など複数ステップを必要とし、多検体高速処理には不向きであった。そこでまず、レポータータンパク質を用いた活性検出方法の構築を試みた。レポータータンパク質として分泌型ルシフェラーゼを採用し、本ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域には CRE(cAMP-responsive element) を配置し、GLP1R シグナルで活性化される転写因子 CREB (CRE-binding protein) により誘導されるように設計した。本誘導型ルシフェラーゼ遺伝子を GLP1R 発現細胞へ導入し、GLP1R 発現レポーター細胞を構築した。本レポーターシステムは合成 GLP1 に加えて、酵母分泌 GLP1 にも応答することを確認し、先に確立した酵母ペプチド分泌系と組み合わせることが可能であることを確認した。続いて、本システムを用いてランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニングを試みた。

GLP1 をコードする DNA をテンプレートとして変異誘発性デオキシヌクレオチドを用いた PCR を行い、ランダム変異 GLP1 ライブラリを作製した。本ランダム変異 GLP1 ライブラリを分泌用プラスミドと共に酵母に導入し、ランダム変異 GLP1 分泌酵母を作製した。本酵母をコロニーとして単離し、約 400 コロニーを 96-well plate へ植菌・培養し、培養上清の GLP1R 活性化能をレポーターアッセイにより評価した。陽性対照として用いた酵母分泌 GLP1FLAG (Wild type) の活性を 100%とした際に、0.1~171%の活性を示す 13 酵母を回収した。これらの DNA 配列からアミノ酸配列を特定した結果、Table 2 (mGLP1-1~13)のよ
うな配列であった。先行研究のアラニンスキャンデータを考慮すると、ほぼ不活性な mGLP1-1 および 2 は 22 番目 Phe の変異が原因の一つと考えられ、その他いくつかの変異体 (mGLP1-3, -5, -7)の活性低下についても同様に説明できると考えられた。一方、K28R/R30G 変異を持つ mGLP1-12 および 13 は wild type に比べて高活性を示した。特に mGLP1-13 は、活性保持に重要と考えられる 6 番目 Phe の非等価なアミノ酸への変異を有しているにもかかわらず、最も高活性であった。

Table 2 ランダム変異 GLP1 ライブラリの活性評価

ペプチド名	相対活性 (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Wild type	100	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R
mGLP1-1	0.133	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	H	L	E	G	Q	A	A	R	G	S	I	A	W	L	V	G	G	R
mGLP1-2	1.76	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	Q	E	L	I	A	W	L	V	K	G	R
mGLP1-3	14.6	H	A	E	G	A	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	R	K	G	R
mGLP1-4	14.9	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	G	S	Y	L	E	G	Q	I	A	K	E	F	I	A	W	L	V	E	G	R
mGLP1-5	15.7	H	A	E	G	T	F	T	S	D	I	S	S	C	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R
mGLP1-6	16.7	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	P	Y	L	E	G	Q	A	V	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R
mGLP1-7	22.2	H	A	E	G	T	F	T	N	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	E	E	F	I	A	W	L	V	E	G	R
mGLP1-8	46.7	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	I	W	L	V	R	G	R
mGLP1-9	71.1	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	E	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R
mGLP1-10	93.8	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	G	S	Y	L	E	G	Q	A	A	R	E	F	I	A	W	L	V	K	G	R
mGLP1-11	125	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	K	G	K
mGLP1-12	149	H	A	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	K	E	F	I	A	W	L	V	R	G	G
mGLP1-13	171	H	A	E	G	T	L	T	S	D	I	S	S	Y	L	E	S	Q	A	A	R	E	F	I	A	W	L	V	R	G	G

■ 活性 < 0.1% ■ 3.7% < 活性 < 7.9% ■ 17% < 活性 < 52% □ 65% < 活性

*各色での塗りつぶしは Wild type のアミノ酸を Ala へ置換した際の活性変化を示す

*下線赤文字は取得したランダム変異 GLP1 の変異箇所を示す

3. 薬剤耐性ノイラミニダーゼ提示酵母の作製および薬剤スクリーニングへの応用

タミフル耐性インフルエンザウイルスは H274Y 変異ノイラミニダーゼ (NA) を有するが、今後も新規の耐性ウイルスが出現すると想定され、それら薬剤耐性酵素に対して有効な阻害剤探索が継続的に求められると考えられる。薬剤探索の第一ステップは標的タンパク質の調製であるが、従来の宿主内部発現による生産は細胞破碎や精製を必要とし、また、収量確保も困難である。そこで、酵母表層提示技術を応用し、野生型および薬剤耐性 NA を迅速に調製することを試みた。

グルコアミラーゼ分泌シグナル遺伝子の下流に野生型もしくは H274Y 変異を有する NA 遺伝子を配置し、これら DNA 配列を酵母壁タンパク質 α -agglutinin の C 末端 320 アミノ酸領域をコードする遺伝子と連結させたプラスミドを構築した。本プラスミドで酵母 *S. cerevisiae* BY4742 を形質転換し、NA 提示酵母を作製した。経時的な培養に伴う表層提示 NA の酵素活性を測定したところ、野生型および薬剤耐性 NA とともに、培養 24 時間後から有意な酵素活性を示し、培養 72 時間後にピークに到達することが分かった。なお、H274Y-NA は野生型に比べて、1.5-2.4 倍低い酵素活性を有し、これまで報告されている活性傾向と一致した。

次に、医薬応用されている NA 阻害剤 2 種（タミフルおよびリレンザ）に対する表層提示 NA の阻害特性を評価した。その結果、野生型 NA はタミフルおよびリレンザにより用量依存的に活性阻害されたのに対して、H274Y-NA はタミフルによる阻害をほとんど受けなかったことから、表層提示 NA は天然のウイルスノイラミニダーゼと同じ生化学的性質を有していることが示唆された。

これまでに昆虫細胞で分泌生産されてきた組換え NA は 37°C で著しく失活することが報告されている。そこで、酵母表層提示 NA に対する熱安定性を評価した。4°C もしくは 37°C で 72 時間インキュベーションしたところ、4°C 条件に比べて 37°C 条件ではほぼ 100% の活性を保持しており、酵母表層提示 NA は熱安定性が高いと推察された。

これらの結果から、酵母表層提示技術によりインフルエンザウイルスノイラミニダーゼを酵素活性および生化学的特性を有したまま迅速に調製でき、また、熱安定性も良好であることから薬剤探索における標的タンパク質調製法として有用性の高い手法と考えられた。

結論

1. 酵母に分泌生産させた各種 GLP1R アゴニストの機能的活性を GLP1R 発現培養細胞によって直接検出するシステムを構築した。さらに、本システムを用いたモデルスクリーニングでは活性ペプチド分泌酵母のみを特定することができた。本システムでは酵母分泌ペプチドの精製・濃縮および遊離ペプチドを得るための化学合成を必要とせず、有用性の高いペプチド活性評価システムであると期待された。
2. GLP1R の活性化に応答して化学発光するレポーターアッセイシステムを新たに構築し、酵母ペプチド分泌系と組合わせた。これにより多検体の高速処理が可能となり、ランダム変異 GLP1 ライブラリのスクリーニングを行うことができた。
3. インフルエンザウイルスの増殖に関わる野生型および薬剤耐性型ノイラミニダーゼ (NA) の酵母表層提示に成功した。また、本表層提示 NA はウイルス NA に近い生化学的特性を示した。表層提示 NA は酵母を培養するだけで簡単に調製することができ、本アプローチは薬剤探索において変異の多いウイルス性感染症を標的とした創薬研究に貢献できる技術と考えられた。