

摂食抑制作用を持つペプチドの創出に成功 - 分子標的薬の探索に新たな手法を提案 -

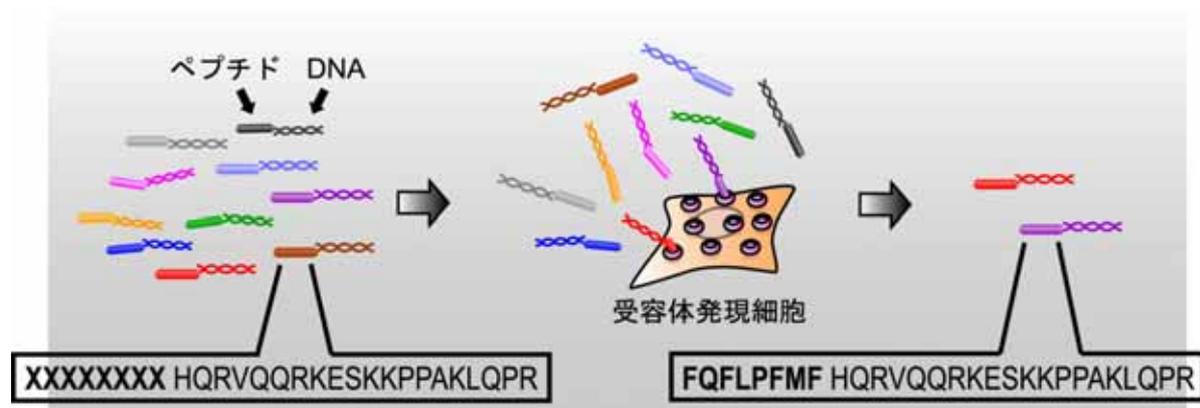
概要

国立大学法人 埼玉大学[学長 上井喜彦] 理学部生体制御学科 坂井貴文教授、上野真吾 研究員(当時、現所属;東京大学)らは、合成したペプチド群から細胞膜受容体に結合するペプチドを選択する手法を開発し、摂食を抑制するペプチドの獲得に成功した。

本研究は、埼玉大学で開発を進めている進化分子工学の技術を用いて、摂食を調節することで知られているグレリン受容体(GHS-R)に結合するペプチドの発見を目指した。グレリン受容体はG蛋白質共役受容体(GPCR)の一種として知られ、GPCRは創薬の標的として有望であることから、今後本手法の分子標的薬探索への応用が期待される。

本研究は文部科学省都市エリア産学官連携促進事業[埼玉・圏央エリア]「タンパク質の高速分子育種を基板技術とする先端バイオ産業の創出」、文部科学省地域イノベーションクラスタープログラム(重点支援枠)[埼玉・圏央エリア]「高速分子進化技術を核とするバイオ・ものづくりクラスターの形成」の一環として行われた。本成果は、2012年6月20日(水)、米国 Eastern time 午後3時米国科学アカデミー紀要(PNAS)のオンライン速報版で公開されました。

URL <http://www.pnas.org/content/early/recent>



20種アミノ酸をランダムに8個並べた256億種($20^8 = 2.56 \times 10^{10}$ 種)のペプチドとそのDNAの複合体混合液(左)を、受容体発現培養細胞に振りかけ(中央)、受容体に結合したペプチドの配列を、そのDNA配列を解析することにより決定した(右)。各アルファベットはアミノ酸を一文字表記したもの。Xは20種アミノ酸のいずれかを示す。

1 研究の背景

病気の原因となっている特定の分子を狙い撃ちし、その機能を抑えることにより病気を治療する分子標的薬は、従来の薬剤に比べ副作用を低く抑えながら治療を行えると期待されている。現在用いられている分子標的薬は主に抗体から作られているが、製造コストが高く、患者の負担が大きという課題を抱えている。

近年、抗体に比べ分子量が小さく、製造コストを低く抑えることが出来るペプチド(ペプチドアプタマー)の分子標的薬としての応用が期待されている。埼玉大学では、独自に開発した進化分子工学技術を用いて、ペプチドアプタマーの開発を行ってきている。

胃から分泌されるペプチドであるグレリンはその受容体に結合することにより、摂食を促進することが知られている。世界的にメタボリックシンドロームが問題となっている昨今、グレリン受容体(GHS-R)の摂食促進作用を阻害することで摂食を抑制する抗肥満薬の開発が期待されている。

本研究では、高速分子進化技術を培養細胞に応用して、GHS-R に結合してグレリンの効果を抑える新たなペプチドの創出を行った。

2 研究内容と成果

グレリンは、1999 年に日本で発見されたペプチドホルモンであり、その受容体 (GHS-R) に結合することにより摂食を促進することが知られている。本研究は、埼玉大学で開発を進めている進化分子工学技術 cDNA display 法 (ペプチドとその配列情報が記録されている DNA を 1:1 対応で共有結合させる技術) を用いることにより、GHS-R に結合し、その活性を阻害するペプチドを獲得したものである。

GHS-R 結合ペプチドの探索は以下のように行った (図 1 参照)。

- ・ グレリンペプチドの N 末端 8 アミノ酸をランダムな 20 種アミノ酸の組み合わせにした 256 億種 (20 種アミノ酸 x 8 個の組み合わせ $20^8 = 2.56 \times 10^{10}$ 種) のペプチドとその配列情報が記録されている DNA を共有結合させたペプチド-DNA 複合体の混合液を作製。
- ・ 256 億種のペプチド-DNA 複合体を、GHS-R を細胞膜上に発現した培養細胞に振りかける。
- ・ GHS-R に結合したペプチド-DNA 複合体を回収する。
- ・ 回収したペプチド-DNA 複合体の DNA 部分を PCR 法により増幅する。
- ・ 増幅した DNA の配列情報を元に、再度ペプチド-DNA 複合体混合液を作製し、GHS-R 発現培養細胞にペプチド-DNA を振りかける。

以上の操作を 5 回繰り返すことによって、数種のペプチド配列を選び出した。それらの配列と、既存の GHS-R 結合ペプチドの配列との間に相同性は無く、新規のペプチドであった。

選び出したペプチドのうち 1 種類を、培養細胞等を用いて機能解析したところ、GHS-R に結合し、その機能を阻害することが分かった。次に、そのペプチドをマウスに静脈内投与したところ、有意に摂食を抑制する機能を有していることが分かった (図 2)。

本研究で得られたペプチドの GHS-R 抑制活性は既存の GHS-R 抑制分子と比べ、決して高いものではないが、L 型アミノ酸のみで構成される GHS-R 抑制ペプチドとしては初の発見である。このペプチドを元にした抗肥満薬や研究用試薬の開発が期待される。

また、GPCR は構造が複雑なため、構造を保ったまま単離することが困難である。それ故、GPCR に対するペプチドアプタマーの探索は余り進んでいなかった。本研究では、GPCR を細胞膜上に発現している培養細胞を結合標的として用いることで、GPCR に結合し、生理作用を有するペプチドの探索が容易に行えることを示した。

3 今後の期待

本研究で得られたペプチドを元にした、抗肥満薬や研究用試薬の開発が期待される。また、GPCR 等の細胞膜受容体を標的とするペプチド性分子標的薬の探索法の一つとして、本研究で用いられた手法が使われることが期待される。

4 原論文情報

"In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display" Ueno, S., Yoshida, S., Mondal, M., Nishina, K., Koyama, M., Sakata, I., Miura, K., Hayashi, Y., Nemoto, N., Nishigaki, K., and Sakai, K. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (in press)

5 参考図又は写真等

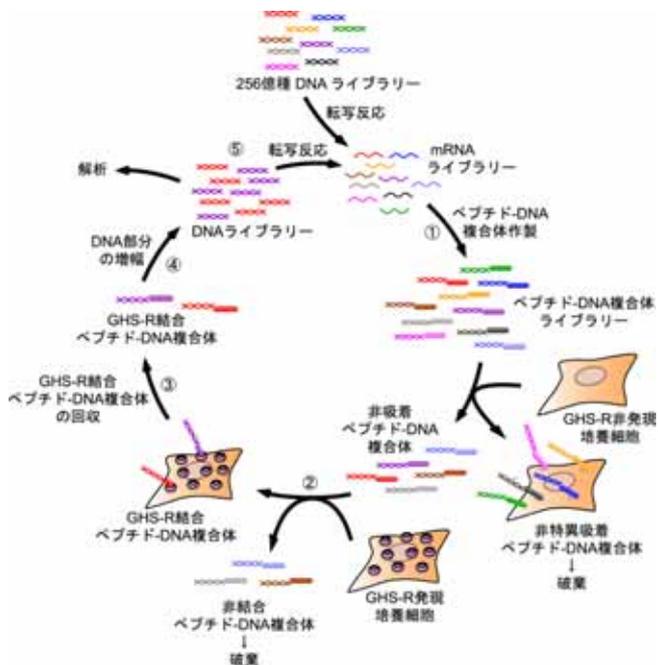


図 1. GHS-R 結合ペプチドの探索法 256 億種のペプチド-DNA 複合体混合液を作製。ペプチド-DNA 複合体混合液を、GHS-R 発現培養細胞に振りかける。GHS-R に結合したペプチド-DNA 複合体を回収する。回収したペプチド-DNA 複合体の DNA 部分を PCR 法により増幅する。増幅した DNA の配列情報を元に、再度ペプチド-DNA 複合体混合液を作製し、GHS-R 発現培養細胞に振りかける。以上の操作を繰り返すことにより GHS-R 結合ペプチドを濃縮する。

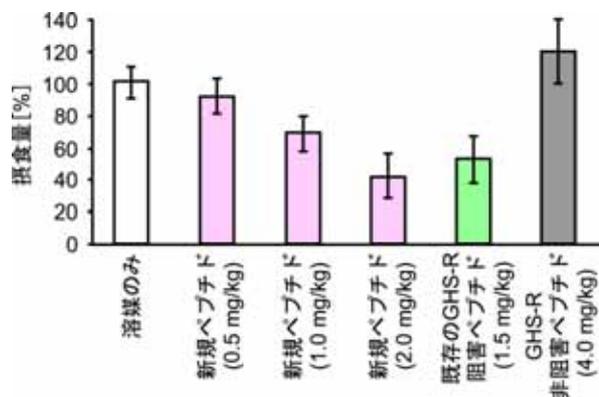


図 2. ペプチド投与後 1 時間のマウスの摂食量を測定したもの。溶媒のみを投与したときの値を 100%として記載。本研究で発見された新規ペプチドは、投与量依存的にマウスの摂食を抑制した。カッコ内は体重 1kg 当たりの投与量。

6 用語解説

ペプチド

アミノ酸が結合した構造を持つ分子。タンパク質も同様の構造を持つが、ペプチドはタンパク質よりも短いものを指す。

細胞膜受容体

細胞膜上に存在し、細胞外ホルモンや神経伝達物質と結合して、細胞の内側に情報を伝達する蛋白質の総称。

G 蛋白質共役受容体(GPCR)

細胞膜受容体の 1 種。疎水性のアミノ酸からなる細胞膜貫通部位を 7 か所持つ。 、 、 のサブユニット

トからなる三量体 G 蛋白質を介して、受容体刺激の情報を細胞内へ伝達する。創薬の主要な標的分子の一つ。

進化分子工学

自然界に存在する種々の蛋白質は数十億年の進化の産物である。この分子進化を実験室内で人為的に高速に行う技術を進化分子工学という。進化分子工学により、既に様々な蛋白質やペプチドが得られている。

分子標的薬

病気の原因となる特定の分子を標的として、標的分子に特異的に結合することにより、その分子の機能を阻害する薬剤。ゲフィチニブ(商品名:イレッサ)に代表される低分子化合物や、トラスツズマブ(商品名:ハーセプチン)に代表される抗体が主に用いられている。

ペプチドアブタマー

標的分子に特異的に結合する人工ペプチドの総称。抗体と比べ安価に合成でき、化学修飾等も容易であることから、抗体に代わる分子標的薬、診断薬の候補として期待されている。主に進化分子工学技術を用いることにより作製される。

問い合わせ先

埼玉大学 理学部 生体制御学科

担当教員 坂井 貴文

TEL 048-858-3869

e-mail tsakai@mail.saitama-u.ac.jp