

ファージディスプレイ法を用いた硫酸化糖鎖特異的認識ペプチドの創出

矢部 富雄

(岐阜大学応用生物科学部)

はじめに

プロテオグリカンの糖鎖部分を構成するグリコサミノグリカン¹は、線虫からほ乳類まで広く保存された糖鎖で、細胞表面や細胞外マトリクスに存在し、ヒアルロン酸を除いて高度に硫酸化された構造をもつ特徴がある。例えばヘパラン硫酸は、複数種の硫酸基転移酵素による分子内への複雑な硫酸基付加反応により多様な構造を形成しているが、この構造は細胞外の環境に応じて発現が制御され、特定の硫酸化構造は細胞内の特定の機能を調節し、器官や組織における生理作用の制御に重要な役割を担うと考えられている。このような硫酸化糖鎖の生体内における意義を明らかにするためには、生体内における特有の糖鎖構造（すなわち硫酸化パターン）の局在と生物学的機能との間に相関の有無を検討する必要があるが、硫酸化糖鎖は抗原性に乏しく、抗体の作成が困難であり、既存の抗体を利用した免疫染色法による可視化は非常に限定的である。よって、いまだ糖鎖が生物学的機能調節に果たす役割の解明は困難を極め、不明な点が多い。

現在、抗コンドロイチン硫酸抗体や抗ヘパラン硫酸抗体などの糖鎖抗原に対する抗体が市販されているが、これらが認識するエピトープは比較的汎用性が高い構造であり、微細な硫酸化構造の変化を検出することには不向きである。そこで、筆者らはより限定された硫酸化構造を特異的に識別する分子プローブの取得を目指し、グリコサミノグリカンの一種であるヘパリンを標的として、ファージディスプレイ法を用いてペプチドプローブの創出を試みた。

本稿では、具体的なアプローチの紹介を通じて、現状の問題点と将来的な改良点を指摘したい。

1. ファージディスプレイ法

ファージディスプレイ法は、バクテリオファージゲノム

に組み込まれた外来 DNA 配列を融合タンパク質としてファージ表面に発現させ、提示された外来タンパク質・ペプチドの中から標的分子との相互作用を有するものを効率良く選択する方法として、様々な分野の研究に用いられている。この方法は、1985年にGeorge P. Smithが繊維状ファージの外殻タンパク質 g3p の遺伝子内に抗原となるペプチド配列を発現させた後、抗血清との相互作用を利用して効率的に回収が可能となったことを Science 誌に報告した²ことを端緒としている。現在では、目的の機能をもったポリペプチドを迅速に単離する方法として発展を続けており、簡便な抗体の作成や新規の生理活性ペプチドの創製など広い分野で応用されている技術である。

ファージディスプレイ法には、これまで繊維状ファージ M13 が主に用いられてきたが、取り扱いが容易な T7 ファージの利用も近年増えている。M13 ファージは、環状の一本鎖ゲノム DNA を 5 種類の外殻タンパク質が取り囲んだ細長い筒状の構造をもつバクテリオファージであり、非主要外殻タンパク質である g3p の遺伝子内に外来の遺伝子を挿入することが多い。ファージ粒子の先端に 5 分子存在する g3p は、分子数が少ないことから強いアフィニティを有するポリペプチドの単離に有利であり、分子量約 5 万程度までのポリペプチドの提示が可能である。一方で、弱いアフィニティを有するポリペプチドを単離したい場合は、主要外殻タンパク質でファージあたり約 3 千分子存在する g8p に 5~8 アミノ酸残基のペプチドを提示させることができる。また、T7 ファージは、415 分子存在する外殻タンパク質 g10p の N 末端または C 末端にポリペプチドを提示させることができる上、タンパク質変性剤の存在下においても感染能を維持できることが特徴であり、繊維状ファージを用いた場合とは異なるポリペプチドの単離への有効性が期待されている。

2. 標的となるヘパリンの調製

高硫酸化糖鎖であるヘパリンは、構成糖組成が同一のヘパラン硫酸と比べて構造多様性が低いとはいえ、分子内硫酸化パターンは均一ではない。すなわち、特定の硫酸化構

Development of the peptides that recognize glycosaminoglycans structure-specifically through phage display technique
Tomio Yabe (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, Gifu 501-1193, Japan)

テクニカルノート

造を標的とする分子プローブを効率的に得たい場合、市販ヘパリンを何らかの方法で構造特異的に選別する必要がある。そこで、筆者らはより均一性の高い標的ヘパリンを得るため、アンチトロンビン III (AT) を固定化したアフィニティカラムを利用して、ヘパリンを精製した。AT は、ヘパリンと相互作用して血液凝固因子であるトロンビンと強固に結合し、凝固作用を阻害するセリンプロテアーゼインヒビターである。この AT のヘパリン結合部位と結合するヘパリンには、特異な硫酸化パターンをもつ 5 糖残基が含まれている²⁻⁴⁾。

ヘパリンは分子サイズが大きい上に表面電荷が高いため、ファージディスプレイ法の際にプレートへのコーティングが難しい。そこで、ヘパリンの還元末端にビオチンを導入し、ストレプトアビジンがコーティングされたプレートへ効率よく固定化するようにした。具体的にはまず、ブタ小腸由来ヘパリンの還元末端を、ギ酸アンモニウムとシアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いる Borch 反応により還元的にアミノ化した後、AT アフィニティカラムクロマトグラフィーに供し、1 M NaCl により溶出されるヘパリンを得た。こうして得られたヘパリンは、AT に結合する 5 糖残基を分子内に含み、かつ還元末端にはアミノ基が導入されているため、N-ヒドロキシスルホスクシンイミドにより活性化したビオチンを反応させることにより、還元末端が選択的にビオチン標識される。ヘパリン分子内には遊離のアミノ基は少ないため、還元末端以外でビオチン標識されることは少なく、また、還元末端をビオチン化することで、固定に際し分子の構造変化(標的性が失われる)を最低限に抑えることができると考えている。こうして得られたビオチン化ヘパリンは、ストレプトアビジンプレートに固定化してファージディスプレイ法のパニングに使用する他、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を利用する際にストレプトアビジンセンサーチップに固定化することが可能である。

3. ファージディスプレイ法によるスクリーニング

ビオチン化ヘパリンを固定化したプレートを BSA によりブロッキング処理した後、繊維状 M13 ファージにマウス脳由来 cDNA ライブラリーを導入して構築されたファージライブラリーをプレートに添加して AT 結合性ヘパリンと相互作用するポリペプチドを提示するファージを選別した。筆者らは以前に、マウス脳において発生時期や部位に応じてヘパリン硫酸の構造がダイナミックに変化することを報告しており⁵⁾、それ故にマウス脳には糖鎖の硫酸化パターンを識別するタンパク質が多く含まれている可能性があると考えた。

ヘパリンに結合したファージは、宿主である大腸菌に感染させることで回収し、一晚培養することで増幅を行った。なお、ファージ中にパッケージングされているファージミドベクターには、融合タンパク質のみがコードされているため、感染した大腸菌内で単独では完全なファージを形成することができない。そこで、他のファージ構成タンパク質を供給するために、M13KO7 ヘルパーファージを利用する。ヘルパーファージゲノムには、複製起点やパッケージングシグナルに変異があり、ファージミドベクターよりもファージ中にパッケージングされにくいいため、ポリペプチドを提示したファージ中にはその遺伝子をコードするファージミドベクターが優先的にパッケージングされる。こうしてヘルパーファージを重感染させて得られたファージを、再びヘパリン固定化プレートに添加してバイオパニングを繰り返し、最も結合活性のあるラウンドのファージ溶液から、ファージクロンを単離、増幅および精製を行って、DNA シークエンサーにより塩基配列を解析した。なお、ファージの AT 結合性ヘパリンへの結合活性は、抗 g8p 抗体を用いた ELISA によって確認した。

4. 糖鎖構造認識特異性の評価

得られたファージクロンのアミノ酸配列を比較した結果、「RTRGSTREFRTG」という 12 アミノ酸残基の共通配列が得られた。そこで、この配列をホモロジー検索したところ、マウス脳由来 cDNA が逆向きに挿入されて発現したポリペプチドで、天然には存在しない配列であったため、筆者らはこのペプチドを「Happy (heparin-associating peptide Y)」と名付け、合成ペプチドにより糖鎖構造認識特異性を評価した⁶⁾。

合成ペプチドと AT 結合性ヘパリンとの構造認識特異性を測定するため、SPR 法を利用した。前述のビオチン化ヘパリンを用い、ストレプトアビジンがコーティングされたセンサーチップに固定化した。固定化に問題がないことを評価するため、AT をアナライトとして分子間相互作用を測定したところ、 K_D が 7.66 nM と強い結合が算出され、これは以前に報告された K_D 値⁷⁾ と相違がないことを確認した。

まず、濃度の異なる Happy ペプチドをアナライトとして AT 結合性ヘパリンとの相互作用を測定した結果、濃度依存的な反応が検出され、Happy がヘパリンを認識していることが確認された(図 1)。また、Happy は AT アフィニティカラムに結合しないヘパリンとは相互作用しないことが示された⁶⁾ことから、AT 結合性ヘパリンのもつ硫酸化構造をより厳密に識別していることがわかる。さらに、コンピューターモデリングにより、AT 結合 5 糖配列

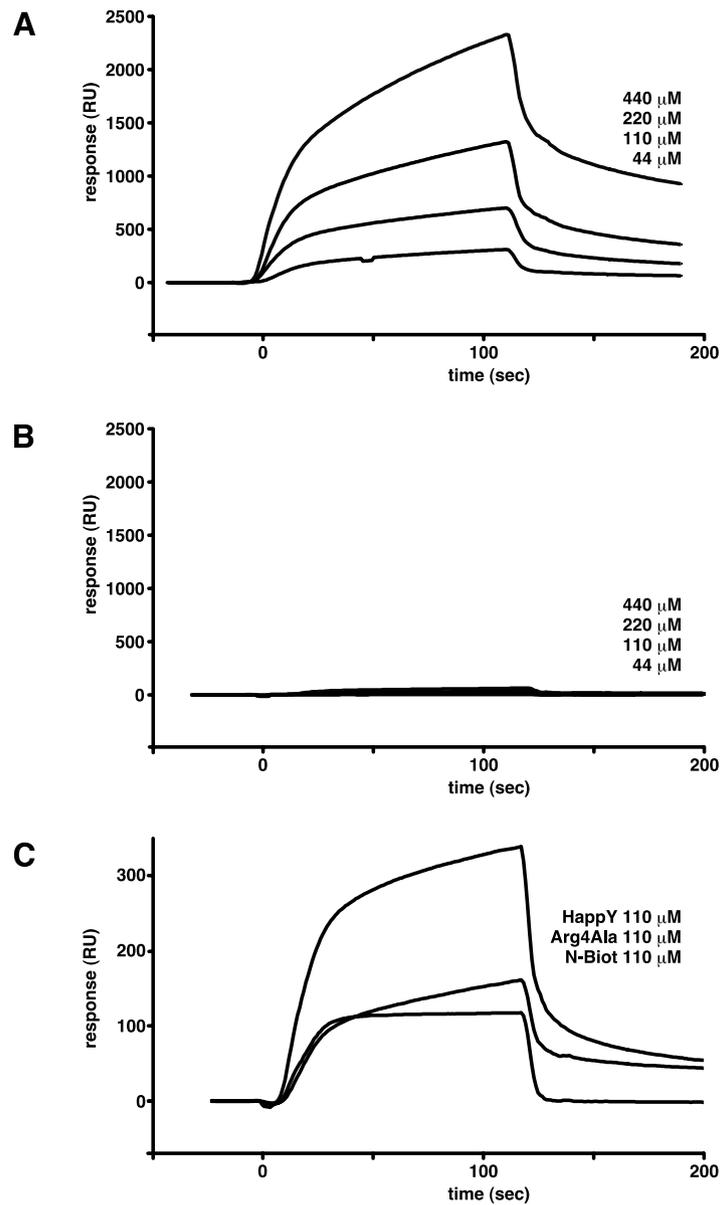


図1 HapY ペプチドおよび改変ペプチドの AT 結合性へパリンへの相互作用解析 (文献6より引用)

A, HapY のへパリンに対する相互作用を SPR 測定により検討した結果、濃度依存的な相互作用が確認された。B, HapY のアルギニン 4 残基をすべてアラニン残基に置換したペプチドで SPR を測定した結果、相互作用は確認されなかった。C, HapY の 4 番目のアルギニン残基をアラニン残基に置換したペプチド (Arg4Ala) では結合親和性に変化はなかったが、N 末端のアルギニン残基をビオチン化 (N-Biot) するとへパリンとの結合親和性が大幅に低下した。

と HapY ペプチドの結合配置を予測したところ、4 残基存在するアルギニンのうち、N 末端側から 4 番目のアルギニンのみ結合に関与していないことが推測されたため、すべてのアルギニンをアラニンに置換したペプチドと、C 末端側のアルギニンのみをアラニンに置換したペプチドを合

成し、SPR 法により測定した。その結果、予測通り N 末端側から 4 番目のアルギニンはへパリンとの結合に関与していないことが示唆された (図1)。また、N 末端側のアルギニン残基にビオチンを導入したところ、へパリンとの結合親和性が大幅に低下した (図1) ことから、HapY

テクニカルノート

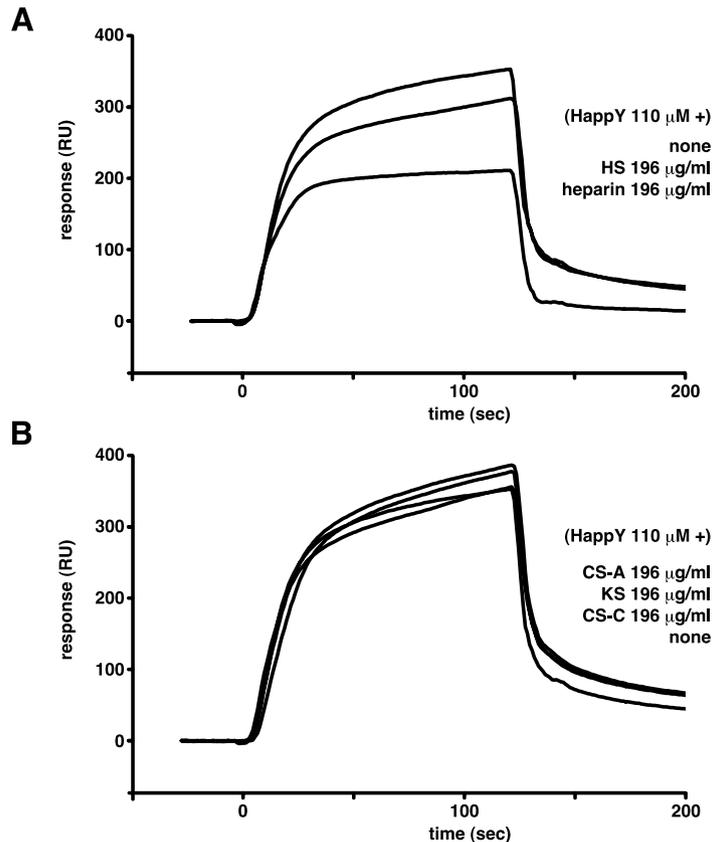


図2 HappYペプチドの結合特異性解析 (文献6より引用)

A, HappYの糖鎖構造認識特異性を検討するため, HappYとヘパリンもしくはヘパラン硫酸を同時にセンサーチップに添加すると, ヘパリンに対する相互作用がヘパリンで強く, ヘパラン硫酸で弱く競合阻害を示した. B, HappYとコンドロイチン硫酸 type A (CS-A), コンドロイチン硫酸 type C (CS-C), もしくはケラタン硫酸 (KS) を同時にセンサーチップに添加すると, 結合親和性に影響はみられなかった.

ペプチドとAT結合性ヘパリンの結合様式が支持された. さらに, ヘパリン固定化センサーチップに対してHappYペプチドと同時に他の硫酸化糖鎖(ヘパラン硫酸, コンドロイチン硫酸, ケラタン硫酸)を作用させたところ, ヘパリンより弱いもののヘパラン硫酸は競合阻害を示した(図2A)のに対し, 他の硫酸化糖鎖はまったく影響がみられなかった(図2B)ことから, HappYペプチドは構造特異的に糖鎖を認識していることが強く示唆された.

5. 糖鎖構造特異的認識ペプチドの利用

HappYペプチドはヘパリンを構造特異的に認識するペプチドであり, ヘパリンが関与する生物活性の制御物質として利用できる可能性がある. そこで, トロンビンのセリンプロテアーゼ活性を指標として, ヘパリンによるその阻害作用をHappYペプチドが中和できるかを調べた. その

結果, 図3Aに示すように, 濃度依存的にHappYペプチドが阻害作用を中和し得ることが明らかとなった. しかし, この効果を示すペプチドの濃度は比較的高濃度であった. それに対して, ニューロンのモデル細胞であるPC12を用いて, 塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)による神経突起伸長作用に対する阻害効果を調べた結果, HappYは濃度依存的かつ非常に効果的に神経突起伸長を阻害することがわかった(図3B). PC12細胞において, FGF-2はヘパラン硫酸プロテオグリカンの一種であるアグリンを介して神経突起伸長に関与していることが知られていることから⁸⁾, HappYはPC12細胞表面のアグリンを構成するヘパラン硫酸に結合することが示唆された.

6. 現状の問題点と将来的な改良点

AT結合性ヘパリンを標的としてファージディスプレイ

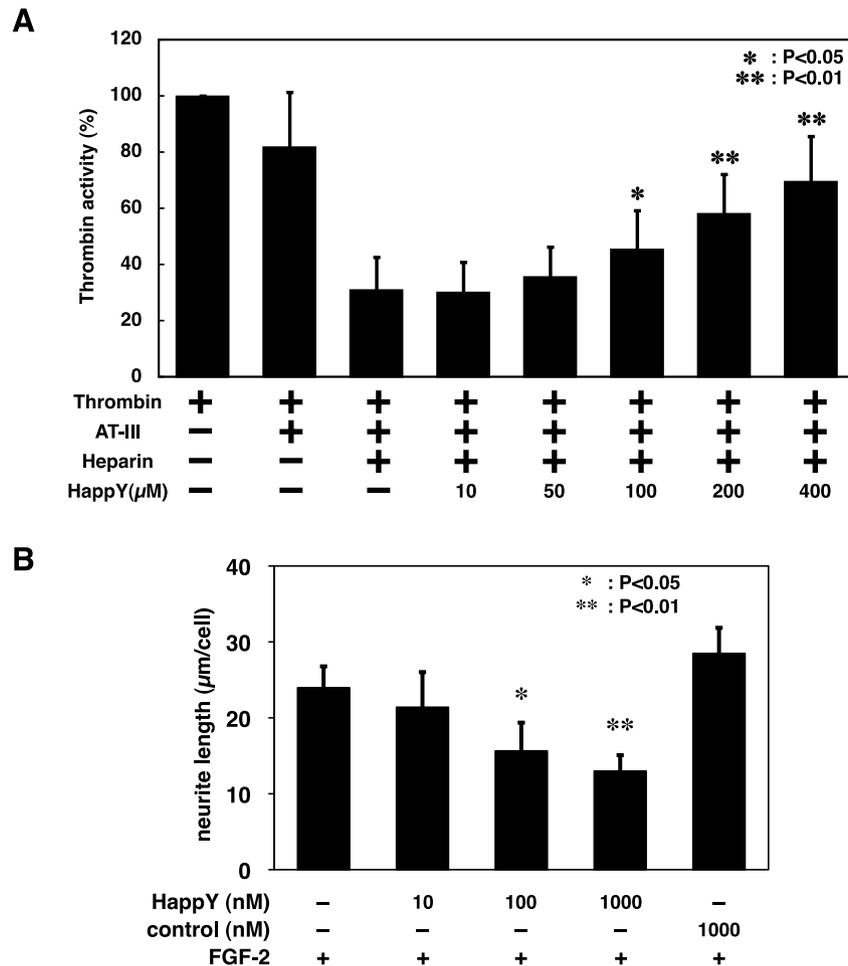


図3 HappY ペプチドの機能性評価 (文献6より引用)

A, トロンビンのセリンプロテアーゼ活性を100%とした際に、0.1 μMのATと25 μIUのヘパリンを添加して阻害されたトロンビンの活性は、HappY ペプチドによって濃度依存的に中和された。B, FGF-2の存在下でPC12細胞を培養する際にHappY ペプチドを添加すると、濃度依存的に神経突起伸長作用を阻害した。また、すべてのアルギニン残基をアラニン残基に置換したペプチド(control)では、阻害作用を示さなかった。

法によって得られたHappYペプチドは、筆者らの期待通り糖鎖の硫酸化構造を厳密に識別するプローブとして利用可能であることが示された。しかしながら、これ以外に得られた他のペプチドは、構造認識特異性が低いものがほとんどであったため、硫酸化糖鎖を構造特異的に識別するプローブをハイスループットに産出することには成功していない。これは、硫酸化糖鎖の表面電荷の高さが原因となり、非特異的に吸着するプローブを効率的に除くことが難しいことに原因があると考えている。そこで現在筆者らは、本稿で紹介した繊維状ファージM13と糖鎖のプレート固定化の組み合わせによるファージディスプレイのみならず、T7ファージライブラリーを利用し、さらに、標的糖鎖を2次元的なプレートではなくビーズに固定化し

て、3次元的な効率化を狙ったスクリーニングを試みている。2000年にNovagen Inc.によって開発されたT7ファージディスプレイ法は、最近では実施例も増えつつあり、これにより、比較的弱い相互作用で硫酸化構造を特異的に認識するペプチドが単離することができると期待される。

おわりに

本稿において紹介したHappYペプチドをさらに有用なものとするため、現在筆者らは組織中の糖鎖構造の変化をダイレクトに可視化する方法を検討している。これは、HappYペプチドのC末端にシステイン残基を付加し、これを標的とする蛍光試薬と反応させることにより可視化するものである。さらに、光架橋剤でHappYを標識するこ

テクニカルノート

とで、標的糖鎖の生体内局在を可視化し、効率的に検出できる有用なプローブとすることを計画している。これにより、糖鎖を介した生物活性の制御機構の解明にさらに一歩近づけるものと期待している。

本研究は、科学研究費若手研究 B, JST シーズ発掘試験, ならびに吉寄清己氏のサポートにより推進されました。ここに感謝いたします。

- 1) Smith, G.P. (1985) *Science*, **228**, 1315–1317.
- 2) Damus, P.S., Hicks, M., & Rosenberg, R.D. (1973) *Nature*,

246, 355–357.

- 3) Rosenberg, R.D. & Damus, P.S. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 6490–6505.
 - 4) Oosta, G.M., Gardner, W.T., Beeler, D.L., & Rosenberg, R.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 829–833.
 - 5) Yabe, T., Hata, T., He, J., & Maeda, N. (2005) *Glycobiology*, **15**, 982–993.
 - 6) Yabe, T., Hosoda-Yabe, R., Kanamaru, Y., & Kiso, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 12397–12406.
 - 7) Munoz, E., Xu, D., Avci, F., Kemp, M., Liu, J., & Linhardt, R. J. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 597–602.
 - 8) Kim, M.J., Cotman, S.L., Halfter, W., & Cole, G.J. (2003) *J. Neurobiol.*, **55**, 261–277.
-