

- Ito, Y. (1999) *Oncogene*, 18, 4055-4062.
- 11) Marahrens, Y. & Stillman, B. (1992) *Science*, 255, 817-823.
  - 12) Kohzaki, H., Ito, Y., & Murakami, Y. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7428-7435.
  - 13) Claycomb, J.M. & Orr-Weaver, T.L. (2005) *Trends Genet.*, 21, 149-162.
  - 14) Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S., & Botchan, M.R. (2002) *Nature*, 420, 833-837.
  - 15) Workman, J.L. (2006) *Genes Dev.*, 20, 2009-2017.
  - 16) Remus, D., Beall, E.L., & Botchan, M.R. (2004) *EMBO J.*, 23, 897-907.
  - 17) Alvarez, M., Rhodes, S.J., & Bidwell, J.P. (2003) *Gene*, 313, 43-57.
  - 18) Cvetcic, C. & Walter, J.C. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16, 343-353.
  - 19) Takeda, D.Y., Shibata, Y., Parvin, J.D., & Dutta, A. (2005) *Genes Dev.*, 19, 2827-2836.
  - 20) Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Haern, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. & Lowe, S.W. (2003) *Cell*, 113, 703-716.

神崎 秀嗣<sup>1,2)</sup>, 村上 洋太<sup>1,2)</sup>

(京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門

<sup>1)</sup>細胞制御, <sup>2)</sup>細胞生物学部門(分子伝達分野))

Regulation of chromosomal DNA replication by transcription factors

Hidetsugu Kohzaki<sup>1,2)</sup> and Yota Murakami<sup>1,2)</sup> (<sup>1)</sup>Department of Viral Oncology, <sup>2)</sup>Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Shogoin-kawaharamachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

投稿受付: 2006年10月16日

## 進化分子工学による機能性ペプチドの創出と低分子化へのアプローチ

### はじめに

生細胞のDNA上にある生体機能分子(タンパク質やペプチド)の設計図は、どのようにして書かれたのだろうか? その設計図はダーウィン進化の過程でDNA上に間接的に書き込まれたと考えられている。すなわち、生細胞は、長い年月をかけて突然変異を蓄積して分子多様性を発生させ、選別を繰り返し、酵素のような高度な機能を持つタンパク質を獲得する。最近、このような自然界における進化の過程「多様性の発生と選別」を人為的にコントロールして、機能性タンパク質の創出を目指す進化分子工学(自然進化と区別するためにコンビナトリアルバイオエン

ジニアリングとも呼ばれる)が注目されている。多様な化合物を一挙に合成する「コンビナトリアルケミストリー」が知られているが、進化分子工学では、化学合成だけでなく、生物学的手法を組み合わせ、人工的な生体触媒や生理活性分子を創出することを狙っている。すなわち、ファージ表層提示法により、多様な分子ライブラリー(ペプチドやタンパク質ライブラリー)を効率的にスクリーニングし、目的とした機能を持つ生体分子を獲得する手法である。ここでは、立体構造を保持したペプチド( $\alpha$ -ヘリックス構造など)の分子ライブラリーを利用する分子標的化合物の設計法について紹介する。

### 1. 分子標的化合物の新手法

この数年来、分子標的化合物のリード化合物探索のために、標的タンパク質の立体構造をもとにした医薬品設計(SBDD)やコンビナトリアルケミストリー(コンビケム)に膨大な研究資金が投入されている。わたしたちは、これまで抗体工学で培ったファージ表層ディスプレイ技術<sup>1,2)</sup>とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、時間のかかる標的タンパク質の立体構造解析(SBDD)や高価な低分子ライブラリー(コンビケム)を必要としない新しいリード化合物検索法を提案している(図1)。すなわち、図2に示すように、強固な立体構造( $\alpha$ -ヘリックスなど)を持つペプチドの分子ライブラリーを構築し、これをファージ表層に提示することにより、標的タンパク質に作用するペプチドを効率よくスクリーニングする(①)。このライブラリーから得られるペプチドは、強固な立体構造を持っているのでファーマコフォアとその空間配置を容易に決定することができる(②)。この立体構造情報をもとに低分子リード化合物を設計する(③)。

### 2. 立体構造規制ペプチドライブラリーの分子設計

近年、ペプチドライブラリーを用いるリード化合物探索法が、医薬品開発に利用されるようになってきた。しかし、従来のペプチドライブラリーでは、個々のペプチドがフレキシブルな構造を持つため、エントロピーの損失が大きく、高い結合活性や生物活性を期待するのが難しい。また、フレキシブルなペプチドからはファーマコフォアの三次元情報が得られず、低分子化合物の分子設計に繋がらない。そこで、このような問題点を解決するために、立体構造を持つペプチドライブラリーを作製するための方法論を開発した。これにより、高い生理活性ペプチドを見いだすと同時に、低分子化するための三次元構造情報を得ること

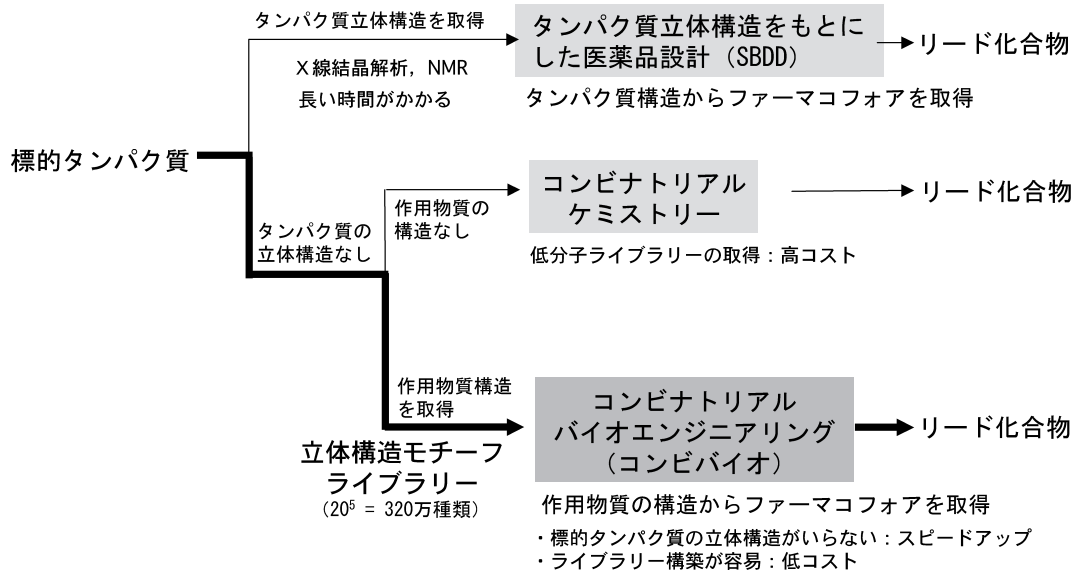


図1 進化分子工学を利用した分子標的化合物の設計法

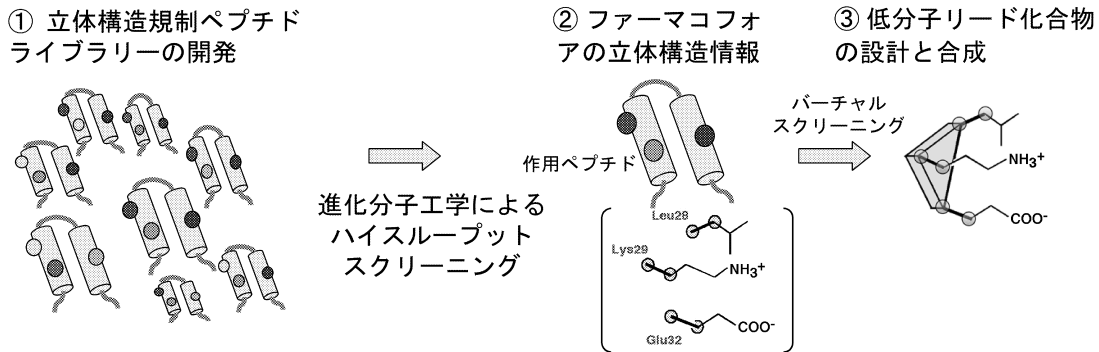


図2 ファージライブラリーとペプチド立体構造設計を組み合わせた新しいゲノム創薬手法

が可能になる。

立体構造を持つペプチドライブラリーとして $\alpha$ -ヘリックス構造ペプチドのライブラリーを構築した(図3)<sup>3)</sup>。ライブラリーの土台にはヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドを用いた。このペプチドは三つの領域で構成される(①14アミノ酸残基からなる構造支持領域、②グリシン7残基からなるループ、③同じく14アミノ酸残基からなるライブラリー領域)。二つのペプチドはLeu残基の疎水相互作用およびGlu残基とLys残基の静電相互作用により寄り添い、安定なヘリックス・ループ・ヘリックス構造を形成するので、外側のアミノ酸残基をさまざまなアミノ酸に置換することができる<sup>4)</sup>。外側のアミノ酸5残基(X部分)をランダム化したペプチドをファージ表面タンパク質上に提示させ、ペプチドライブラリーを作製した。

### 3. G-CSF 受容体親和性ペプチド

本ファージライブラリーをマウス顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体に対してスクリーニングした。G-CSFは白血球の一種である好中球の分化・増殖を誘導する糖タンパク質(分子量約18,000~22,000)で、骨髄移植時の好中球の増加促進剤や抗がん剤の副作用である好中球減少症の治療薬として使用されている。

ファージライブラリーを、固定化したG-CSF受容体と反応させ、結合しないファージは洗い出して、結合するファージを選択し回収した。最終的に、5回パンニング後、G-CSF受容体結合性ペプチドの単離に成功した(図4)。

得られた受容体結合性ペプチドと天然G-CSFとの間にはアミノ酸配列の相同性はない。しかし、ペプチドが $\alpha$ -

ヘリックス構造を持っているため、その立体構造を指標にして天然 G-CSF と重ね合わせが可能になる。既に解析されている G-CSF 受容体の X 線構造を検討したところ、ペプチド C 末端ヘリックスと天然 G-CSF の  $\alpha$ -ヘリックスに相同性が観測され、Leu<sup>28</sup>, Lys<sup>29</sup>, Glu<sup>32</sup> がファーマコフォアとして作用していること、また Ala<sup>35</sup> の Arg 残基への置換が示唆された (図 4)。

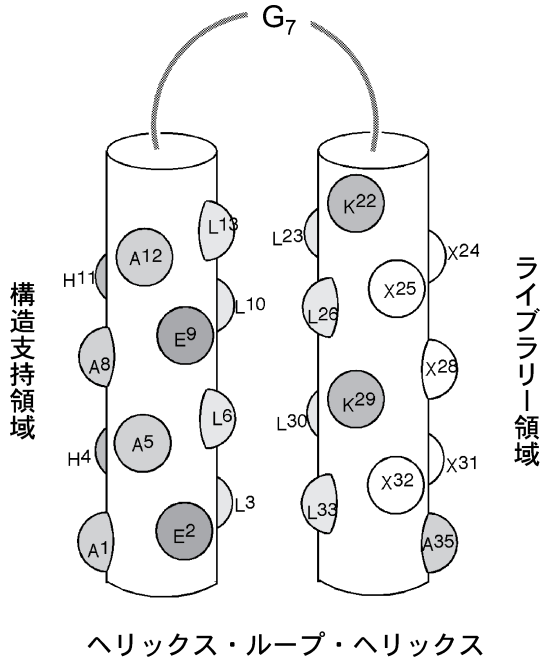


図 3 立体構造モチーフペプチドライブラリーの分子設計：X 部分 (白色) がランダムなアミノ酸で置換される

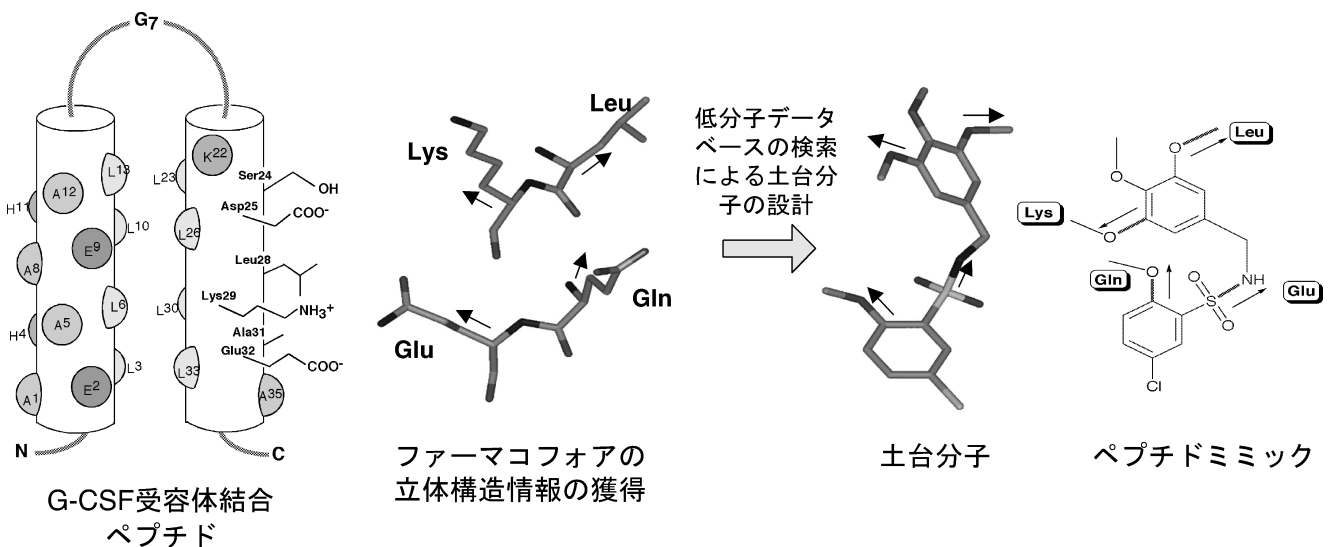


図 4 ファーマコフォアの立体構造情報をもとにした低分子医薬の分子設計

#### 4. タンパク質から低分子リガンドへ

これまでも、生理活性ペプチドからペプチドミミックの分子設計が行われてきている。研究者がまずすることは、その活性コンフォメーションの予測である。その後、部位特異的変異実験等を行い、活性残基を予測し、ペプチドミミックの分子設計をすることになる。そこで、わたしたちは、生理活性ペプチドを検索する際に、立体構造規制ペプチドライブラリーを利用することを提案する。立体構造規制ペプチドライブラリーから検索されるペプチドは、活性残基およびその三次元空間配置の情報を与え、その情報をもとにペプチドミミックの分子設計をすることができる。

先の実験より得られたファーマコフォアの情報をもとにして、G-CSF 受容体リガンドの分子設計を試みた。Leu<sup>28</sup>, Lys<sup>29</sup>, Glu<sup>32</sup> および X 線との重ね合わせから示唆された Gln<sup>32</sup> (結合性ペプチドでは Leu<sup>32</sup>) の  $\alpha$  および  $\beta$  炭素の空間位置と方向を指標として、低分子データベースを検索したところ、土台分子としてスルホンアミド化合物が導き出された (図 4)。本化合物を土台にして、これにアミノ酸側鎖に対応する官能基を導入した化合物を合成し、受容体結合性の低分子リガンドの獲得に成功している。

#### おわりに

近年のゲノム解析の進展は、数多くの重要なタンパク質-タンパク質相互作用を示唆してきている。大腸菌では 6,800 以上、また酵母では 45,000 を超える相互作用があ

ると言われており、ヒトではそれ以上の数になることは疑う余地がない。その多くが重要な生物活性を担っているため、それらをターゲットとする分子標的化合物の設計は、生物学や新薬開発において避けては通れない課題である。従来、分子標的化合物の開発は、酵素阻害剤や神経伝達物質類似化合物をターゲットとしてきたが、それには明白な設計戦略がある。すなわち、酵素阻害剤開発の場合、基質の構造から阻害剤設計の有用な情報を得ることができる。神経伝達物質の場合も同じである。しかし、このような設計戦略は、タンパク質-タンパク質相互作用の分子標的化合物の設計には使えない。この場合、相互作用に重要な接触部位やアミノ酸残基を知るためには、膨大な数の部位変異操作や時間のかかるタンパク質の構造解析が要求される。さらに、たとえ相互作用の接触部位の立体構造が解ったとしても、その情報から低分子化合物を設計するための信頼できる方法論がないのが現状である。わたしたちは、解決策の一つとして、ファージ表層ディスプレイ法（分子

進化工学的手法)を活用した新しい方法論を提案している。本法がタンパク質-タンパク質相互作用の生物学的意義の解明やリード化合物開発の一助になれば幸いである。

- 1) Fujii, I. Fukuyama, S., Iwabuchi, Y., & Tanimura, R. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 463-467.
- 2) Takahashi, N., Kakinuma, H., Liu, L., Nishi, Y., & Fujii, I. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 563-567.
- 3) Suzuki, N. & Fujii, I. (1999) *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6013-6017.
- 4) Fujii, I., Takaoka, Y., Suzuki, K., & Tanaka, T. (2001). *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3323-3325.

藤井 郁雄

(大阪府立大学大学院理学系研究科)

---

A directed evolution of biofunctional peptides in phage-displayed libraries  
Ikuo Fujii (Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8570, Japan)