

平成27年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「新規バイオ医薬（医薬候補ペプチド）探索・発見技術の高度化」

研究開発成果等報告書

平成28年 3月

委託者 関東経済産業局

委託先 公益財団法人埼玉県産業振興公社

目次

第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・研究目的および目標	3
1-2	研究体制	4
1-3	成果概要	4
1-4	当該研究開発の連絡窓口	5
第2章	本論	
2-1.	環状型ペプチドライブラリの開発	7
2-1-1	環状型ペプチドライブラリ構築	7
2-1-2	複環状型ペプチドライブラリ開発	8
2-1-3	環状ペプチドの有効性検証	10
2-2.	リアルタイム分析装置の開発	11
2-2-1	リアルタイム分析装置の設計、製作	11
2-2-2	開発したリアルタイム分析装置の有用性	13
2-2-3	cDNAディスプレイ法での選別工程への適用	15
2-3.	医薬候補ペプチドペプチドの獲得	17
2-3-1	創薬標的分子選定	17
2-3-2	β カテニン結合ペプチドのセレクション概要	18
2-3-3	β カテニン結合ペプチドのセレクション	18
2-3-4	膜透過性ペプチドセレクション	18
2-3-5	次世代シーケンシングによる医薬候補ペプチド選定	20
2-3-6	β カテニン結合ペプチドの合成、プレアッセイ	21
2-3-7	蛍光相関分光法による評価	20
第3章	全体総括	
3-1	研究開発成果	24
3-2	今後の課題	24
3-3	事業化の見通し	25

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的および目標

(1) 研究開発の背景

現在の医薬産業において、医薬品開発効率の著しい低下及び開発費の高騰が大きな問題となっており、その主要な原因の一つとして創薬プロセスにおける医薬候補化合物の探索・発見効率低下が挙げられる。本事業では、cDNAディスプレイ法の高度化及び製薬企業の関心が高い創薬標的に対する医薬候補ペプチド獲得を目指す。

(2) 研究開発の目的

本研究開発では、製薬企業の関心が高い創薬標的に対する医薬候補ペプチド獲得を目的とし、研究実施機関の持つ技術を組み合わせることで、医薬候補ペプチド探索・発見技術(以下、「cDNAディスプレイ法」という)の高度化を図るものである。本研究開発において目指す技術高度化内容についてまとめたものを図1に示す。

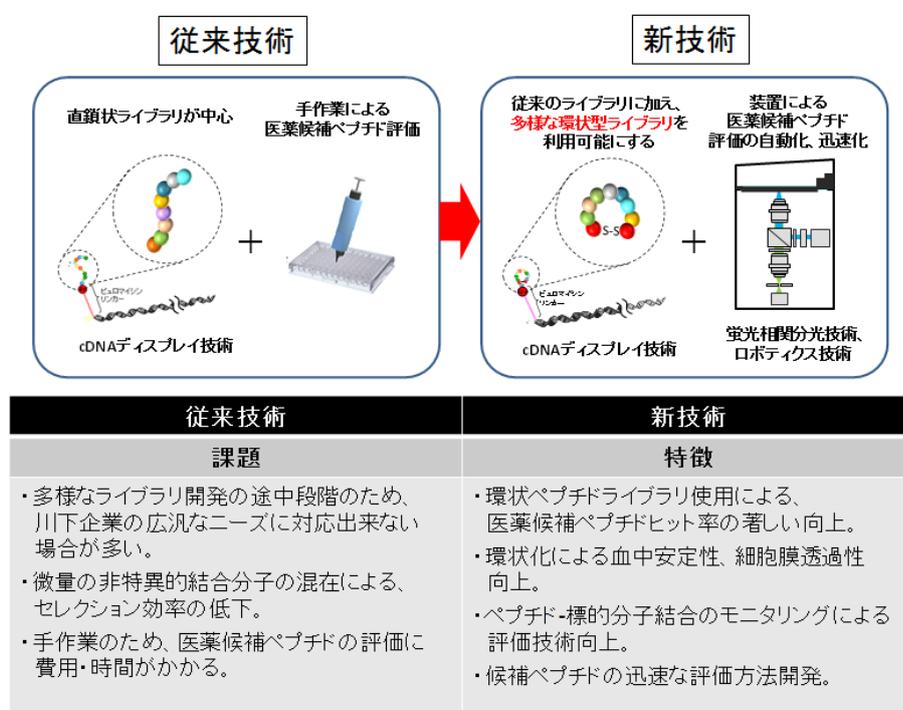
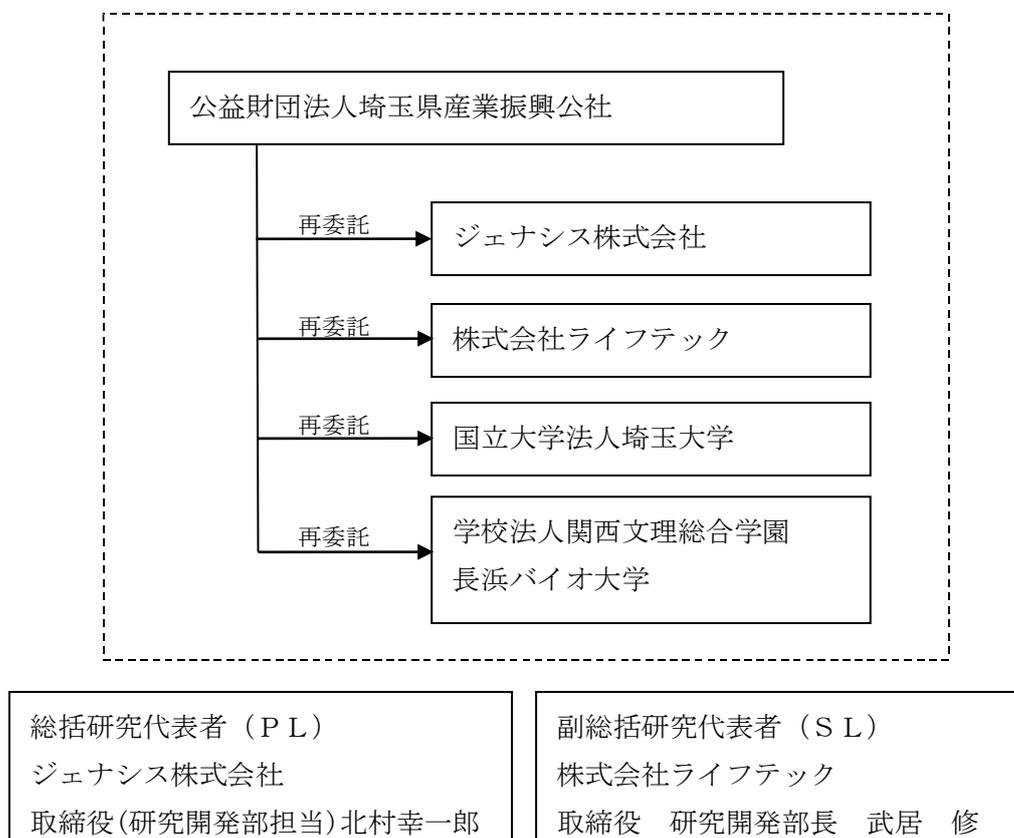


図1 本研究開発で目指す技術高度化内容

1-2 研究体制

本研究開発の研究組織および管理体制を以下に示す。



1-3 成果概要

本研究開発では「医薬候補ペプチド探索・発見技術」を目的に大きく分けて3つのテーマで研究開発を行った。各テーマにおける成果概要を以下に記載する。

テーマ1. 環状型ペプチドライブラリの開発

これまでのセレクションで使用していたペプチドライブラリはアミノ酸が直鎖状に繋がったものが中心であったが、本研究開発では、より安定性が高く、結合力の高い（構造的に安定化するため）ペプチド獲得実現のため、環状型構造を有するペプチドに着目し、様々なタイプの環状型ペプチドライブラリを開発を行った。

テーマ2. リアルタイム分析装置の開発

cDNA ディスプレイ法によるペプチド獲得プロセスをさらに効率化させるため、ペプチドと標的分子の相互作用解析・検出が可能な装置開発を行った。具体的にはライフテック社、長浜バイオ大学が開発してきた蛍光相関分光法を利用した検出装置をベースとして、スクリーニング工程におけるペプチド-標的分子結合のリアルタイム分析が可能な装置を開発した。

この装置の開発により、今まで検討に時間を要したセレクション工程における溶液条件の決定を、即時測定することにより大幅に短縮できる（生産性の向上、低コスト化が可能）。実際にペプチドセレクションへの応用を行い、ペプチド-標的分子の結合が確認可能であることが示された。

テーマ3. 医薬候補ペプチドの獲得

これまでに行ってきた複数の製薬企業との情報交換を通じて、細胞内標的に関する高いニーズが存在しており、その中でも細胞内蛋白質間相互作用(PPI)を阻害あるいは誘導できる化合物の創出が切望されている。

本研究開発では環状型ペプチドライブラリおよび cDNA ディスプレイ法を用いて、細胞内の Wnt タンパクと β -カテニンの複合体形成を阻害するペプチド獲得を行った。さらに、細胞内への送達を視野に入れた膜透過性ペプチドスクリーニング技術および候補ペプチドを効率的に合成、評価する技術の開発も併せて行い、細胞内 PPI 阻害ペプチド獲得を可能とする技術群を構築した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

プロジェクト全体に関すること（事業管理法人）

〒338-0001

埼玉県さいたま市中央区上落合2-3-2

公益財団法人埼玉県産業振興公社 新産業振興部

先端産業振興グループ 主任調査役 長谷部 鉄男

新都心ビジネス交流プラザ3階

Tel : 048-711-6870

Fax : 048-857-3921

Mail : hasebe@saitama-j.or.jp

プロジェクトの技術内容に関すること（総括研究代表者）

〒333-0844 埼玉県川口市上青木3丁目12番18号

ジェナシス株式会社

取締役 北村 幸一郎

Tel : 048-262-1247

Fax : 048-262-1248

Mail : kitamura@janusys.co.jp

第2章 本論

本研究開発の成果概要について、以下に記載する。

2-1. 環状型ペプチドライブラリの開発

2-1-1 環状型ペプチドライブラリ構築

これまでのセレクションで使用していたペプチドライブラリはアミノ酸が直鎖状に繋がったものが中心であったが、本研究開発では、より安定性が高く、結合力の高い（構造的に安定化するため）ペプチド獲得実現のため、環状型構造を有するペプチドに着目し、様々なタイプの環状型ペプチドライブラリの開発を行った（図2）。

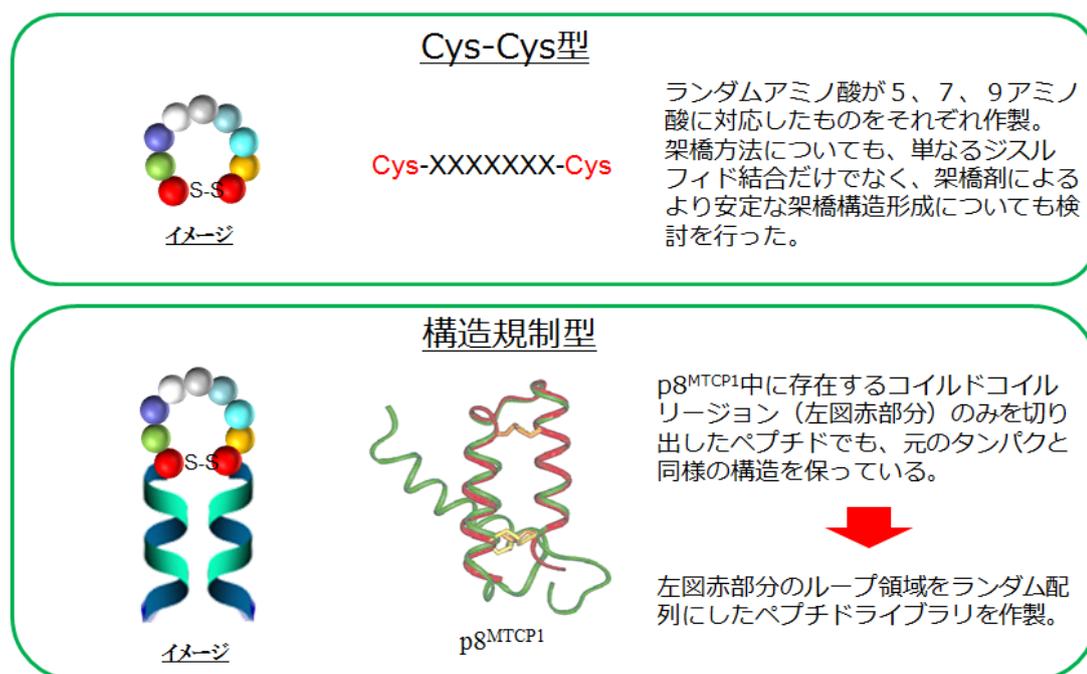
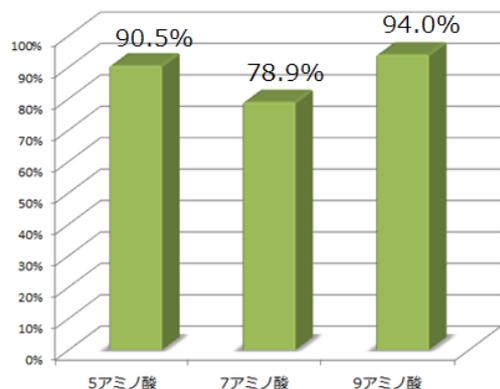


図2 環状型ペプチドライブラリ

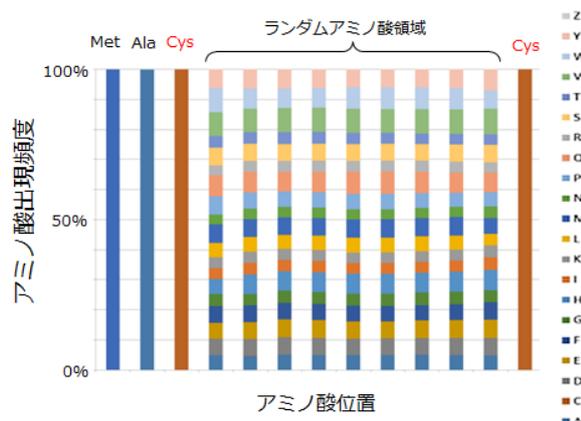
また、作製した環状ペプチドライブラリの品質（環状化効率、アミノ酸出現頻度）を確認したところ、図3に示すように高い環状化効率を示すと共に、出現アミノ酸に大きな偏りが無いなど、環状ペプチドライブラリをセレクションに使用するための十分な性能を有していることを確認した。

環状化効率測定(Cys-Cys型)



サイズにより多少の変動があるが、約8~9割の環状化効率を確認。

アミノ酸出現頻度(Cys-Cys型)



設計通り19種類のアミノ酸が大きな偏りなく出現していることを確認。

図3 環状ペプチドライブラリ性能評価結果

2-1-2 複環状型ペプチドライブラリ開発

さらに、本研究開発では、図4に示すような複環状型構造を有するペプチドを創出するための新規ライブラリ構築も行い、実際にこれを用いてモデルタンパク質（ミドカイン）に対してスクリーニングを行った（図5）。淘汰圧を加えつつより強く結合する架橋ペプチドをスクリーニングした（図6）。3ラウンド目のスクリーニングにより得られた淘汰ライブラリ由来のペプチドについて、システインの平均含有数が3.75個という結果が得られ、平均2個程度のS-S結合を含むペプチドライブラリを作製することに成功した。



図4 複環状型ペプチドライブラリの平均的アミノ酸組成

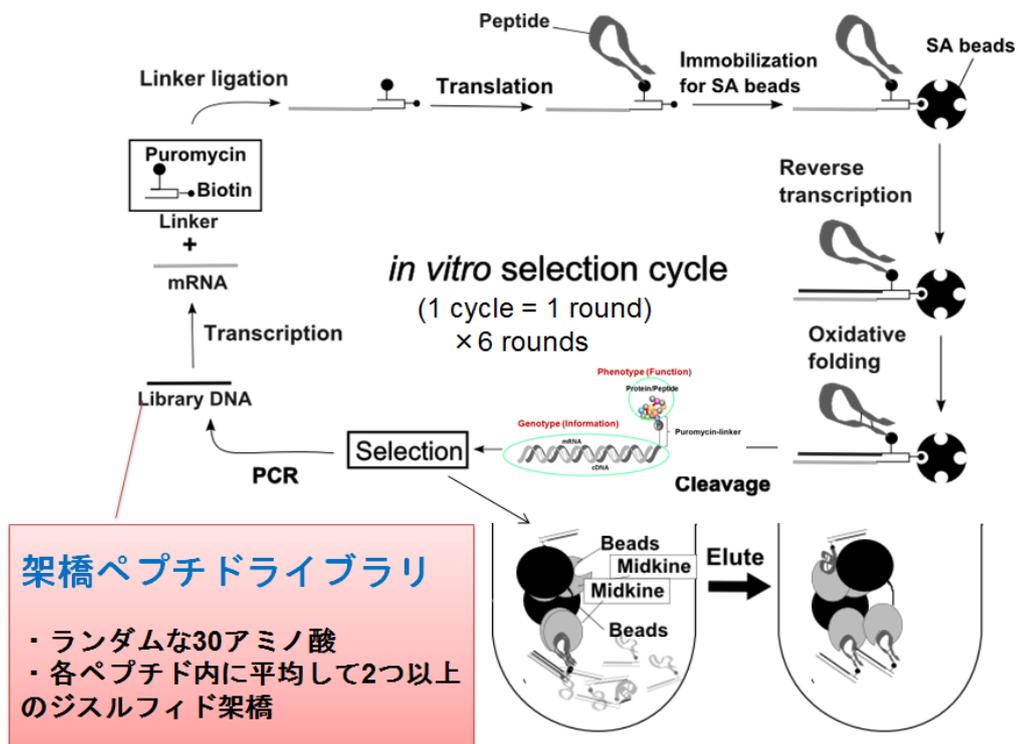


図5 cDNA ディスプレイによる架橋ペプチドのスクリーニング

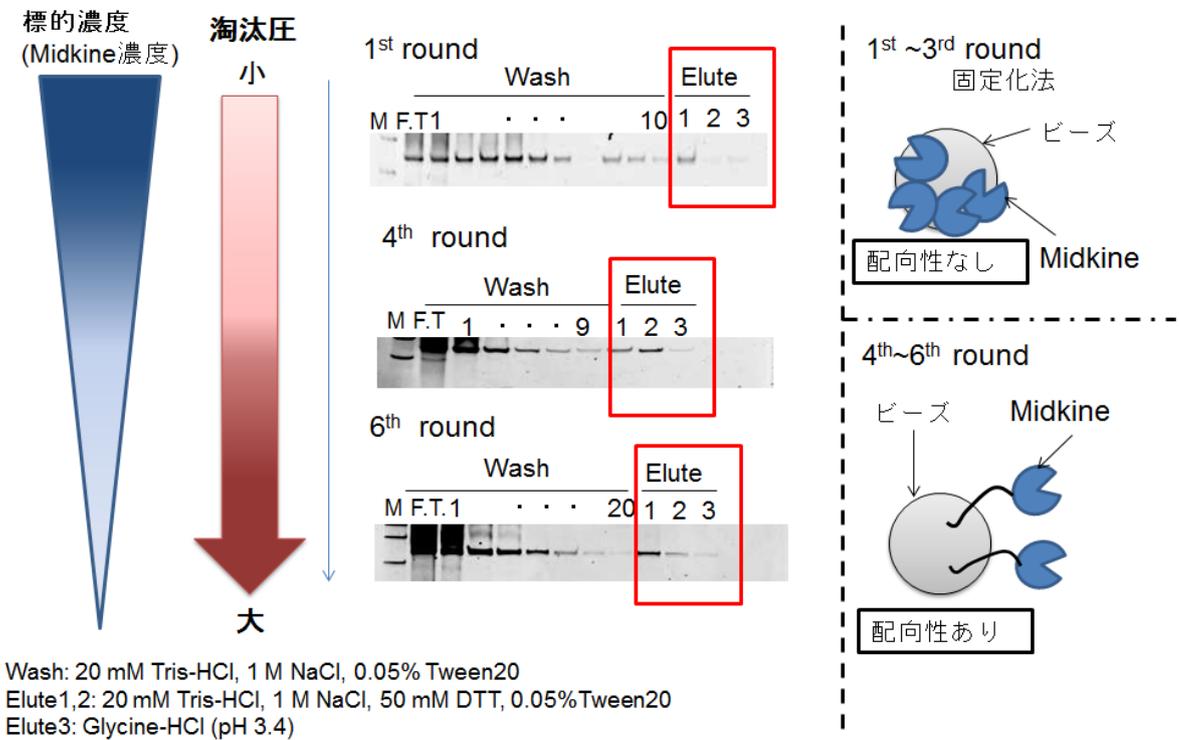


図6 淘汰圧によるスクリーニングとその結果

2-1-3 環状ペプチドの有効性検証

前項で各種環状ペプチドライブラリの開発を実施したが、それら環状ペプチドライブラリの有効性について検証するため、実施機関である長浜バイオ大学およびジェナシスで獲得した得られた細菌毒素に対する結合ペプチド群を基にして、環状化による結合親和性の増減比較により、環状化ライブラリの有効性について検証した。

元々の細菌毒素結合ペプチドは直鎖状構造を有していたが、両末端にシステインを付加することでS-S結合を導入した環状構造ペプチドを作製し、環状化によるターン構造形成が細菌毒素との結合に与える影響について検証するため、直鎖状と環状ペプチドで、細菌毒素に対する結合特性の変化を蛍光相関分光法により解析した。

VacA との K_D 値を算出した結果、最も結合力の強い直鎖状ペプチドは 213 nM であったのに対し、その環状化したペプチドでは 58 nM であった。これらの結果は、ペプチドの環状化により結合力が向上することを示唆している (図 7)。

蛍光相関分光法による結合特性解析

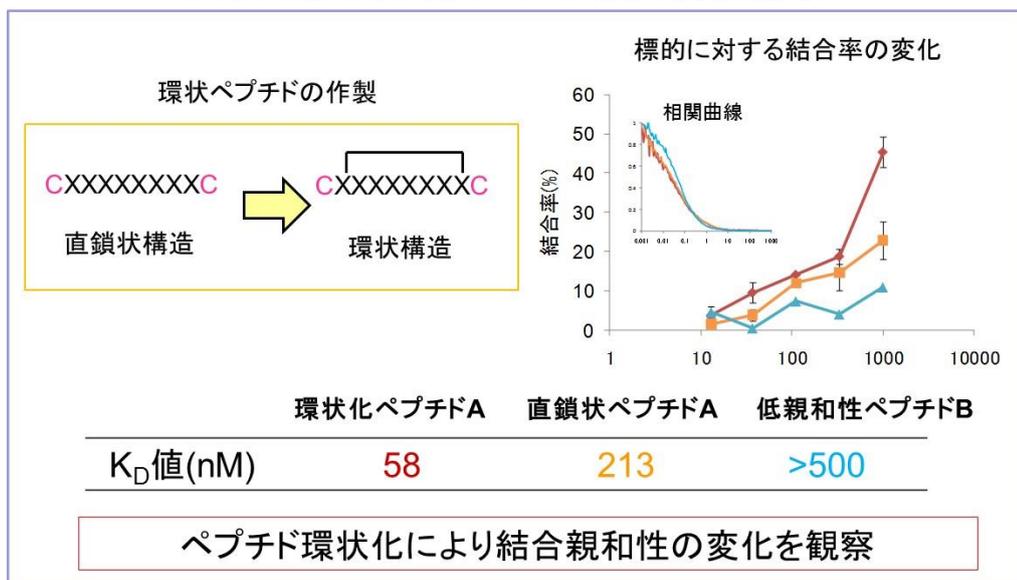


図 7 蛍光相関分光法による結合特性解析

2-2. リアルタイム分析装置の開発

2-2-1 リアルタイム分析装置の設計、製作

cDNA ディスプレイを用いたセレクションにおいて、標的分子-候補ペプチドの結合をリアルタイムでモニタリングすることが可能になれば、淘汰度合の確認およびセレクション工程における溶液条件決定にかかる時間の大幅な短縮が期待される。

本研究開発ではライフテック社および長浜バイオ大学で開発してきた蛍光相関検出装置をベースとして、ペプチド-標的分子の結合をリアルタイムでモニタリング可能とする装置の仕様設計・製作を行った。

今回作製した装置は、水溶液中に微量に存在する標的粒子などの相互作用を、蛍光を利用して分子検出、観察することを可能としたシステムであり、検出の効率化を図るため、ステージを移動させ、光学焦点を試料溶液中においてスキャンさせることで、より高感度な測定を可能とする。測定は標的粒子と結合した蛍光物質とそれ以外の非結合蛍光シグナルを分離し、標的粒子の存在確率（濃度）を計測する、蛍光測定装置である。さらに、本研究ではペプチドのような低分子を観察する必要があり、さらなる高感度化が必要であったため、高感度化を実現するための光学系の変更、光電子増倍管の変更等を実施した、一連の研究開発を経て作製・改良した「蛍光相関によるリアルタイム分析装置」のシステム概略図を図8に、システム光学系概略を図9に、またシステム概観写真を図10に示した。

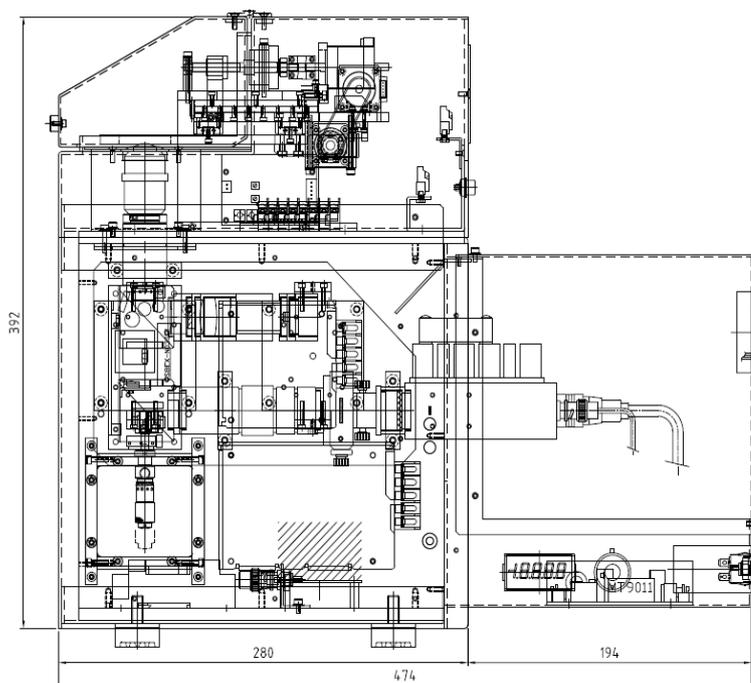


図8 蛍光相関によるリアルタイム分析装置システム概略図

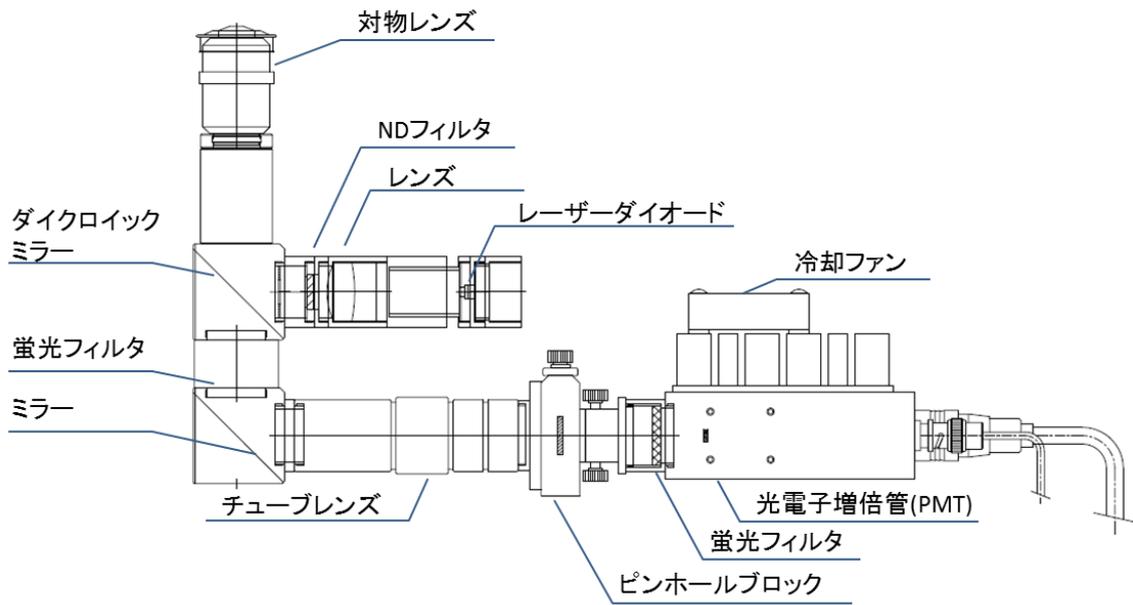


図9 システム光学系概略図

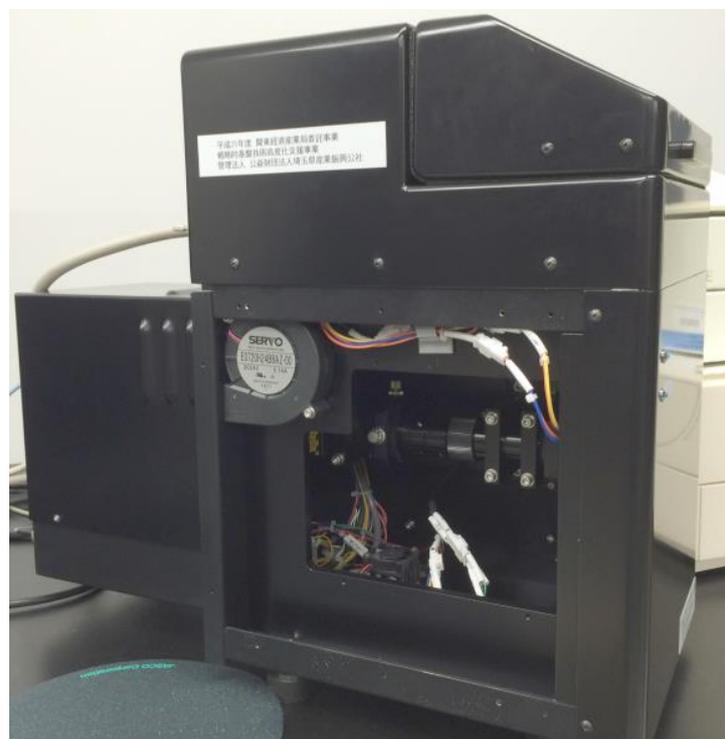


図10 システム外観写真

さらに、本研究開発では「蛍光相関によるリアルタイム分析装置」の検出結果を解析するためのソフトウェアを作製した。本ソフトウェアはペプチド等の低分子物質の結合、またペプチドライブラリから機能性ペプチドスクリーニングを行う際に実施するライブラリ評価等への装置適用を図るため、主として定性的・定量的評価を可能とするものである。

本装置の概要をまとめると

- 1) 共焦点蛍光測定機能（蛍光フォトンカウンティング）
- 2) 試料ステージ（スライドガラス、専用チップなど）をX・Y方向に移動させる機能
- 3) 上記 1)、2)を組み合わせて、試料ステージを任意の向き・速度で移動させながら、蛍光量を測定する機能
- 4) 測定結果を基にした仮判定、結果のファイル保存、結果の再読出し
- 5) 測定結果ファイルを読み込み、解析を行い結果保存するデータ解析機能

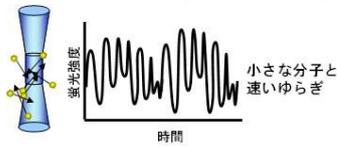
の特徴を有する装置となる。

2-2-2 開発したリアルタイム分析装置の有用性

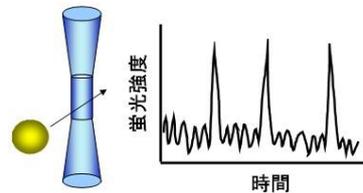
本リアルタイム分析装置は、蛍光相関分光法をその原理としている。蛍光相関分光法では、蛍光標識された分子を共焦点光学系で観察することにより、分子の拡散速度を見積もることができる。実際には、微小な観察領域の通過速度を蛍光強度ゆらぎから求める。分子の大きさの変化は分子の溶液中での動きに大きな影響を与えるため、測定結果は蛍光分子の分子量変化を特徴的に反映する。例えば、大きな分子は、観察領域の通過速度が遅いため、蛍光強度ゆらぎが大きくなる。したがって、この分析法では蛍光標識分子のサイズの変化を測定することができる（図11）。

蛍光相関法は、レーザー共焦点光学系を利用し、微小領域の蛍光ゆらぎを光電子増倍管で検出することで、一分子レベルの溶液内挙動を解析できる技術である。

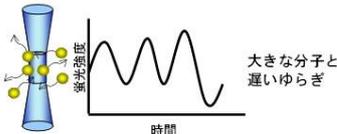
低分子量化合物の蛍光ゆらぎ



微粒子の蛍光ゆらぎ



高分子量物質の蛍光ゆらぎ



ペプチド蛍光標識化技術によりレーザー光照射のみで相互作用解析
ホモジニアスアッセイ(均一溶液系分析)での迅速評価系の実現。

cDNAディスプレイ法の工程における、ペプチドと標的物質との相互作用解析の即時解析が可能となる。それにより、ライブラリ淘汰度合の確認およびセレクション工程における溶液条件決定にかかる時間の大幅な短縮が期待される。(生産性の向上、低コスト化に資する)

図 1 1 蛍光相関分光法による相互作用測定原理

蛍光相関分光法の測定装置は、レーザー共焦点顕微鏡と同様の光学系により回折限界まで絞り込んだ励起光を溶液中の一点に照射する。光電子増倍管を光検出器に用いることにより、この領域から発せられる蛍光を1分子レベルの高感度で検出することができる。絞り込まれた蛍光の観察領域は1フェムトリットル程度と微小であるため、蛍光標識分子がナノモル濃度であれば、平均して数個の分子が観察領域を出入りしている計算になる。この観察領域への個々の分子の出入りが蛍光ゆらぎに反映される。

実際の測定では、対物レンズ上に設置したガラス板(顕微鏡観察で使用するカバーガラスを使用)の上に滴下した20~30マイクロリットル程度の溶液に青色(473 nm)や緑色(530 nm)の可視光レーザーを照射し、その照射領域の蛍光強度を100ナノ秒程度の時間分解能で記録する。これを自己相関解析と呼ばれる数学的処理をすることにより、蛍光分子の大きさや数に関する情報を得ることができる。

蛍光ゆらぎの自己相関解析によって得られる曲線は、いわばゆらぎの平均の振幅と周期を表わしている。分子が観察領域を通過する際に生じた蛍光強度ゆらぎには分子の大きさを反映した周期性が現れる。分子が他の分子と相互作用してサイズが大きくなると、蛍光ゆらぎの平均周期が大きくなり、自己相関曲線は右にシフトする。

本測定装置にはXY軸に精密に駆動する試料ステージを設けてある。これ

は、測定条件最適化の必要性、粘度・温度の影響、および粒子の運動速度が遅いため測定時間を要するといった本原理特有の欠点を克服するためのものである。XY メカニカルステージは、検出ユニットの対物レンズの上に設置され、試料液滴を乗せたガラス板を微細に移動させることができる。XY 軸モーターで移動可能な測定台は、座標・移動距離・円周運動における半径・周回数を設定することにより、直線、円、らせんを組合せた動作が可能である。20 マイクロリットルの試料液滴をガラス板ごと微細に移動させることにより、対物レンズの焦点位置をずらし、液滴中をスキャンすることができる。全体の領域をスキャンすることにより、検出頻度を高めるほか、レーザー光照射による蛍光退色を防ぐ効果もある。例えば、らせん形に蛍光照射部位を動かすことにより、低濃度の蛍光物質の検出頻度が向上した。これは、蛍光退色を抑える効果によるものと考えられる。このメカニズムにより大きく感度を向上させることができた。

2-2-3 cDNAディスプレイ法での選別工程への適用

ランダム配列を有する対応付け分子のプールから標的分子への結合による選別淘汰の様子をモニタリングするために、標的分子と各サイクルの対応付け分子を混合してリアルタイム分析装置で測定し、結合に伴う蛍光シグナルの増加を確認することとした。ここでは、標的分子の詳細は述べないが、抗がん剤標的となりうるタンパク質複合体であり、それに作用する新規機能性ペプチドが得られれば、新しい抗がん剤候補物質の創出が期待できる。

リアルタイム分析装置によるモニタリングでは、サイクル2から5の各ステップの対応付け分子の反応液 $1\mu\text{L}$ (0.13 pmol 程度と見積もられる) と標的分子 500 ng を混合して測定した。その結果、サイクル4および5でシグナルの増加が確認された。この標的分子はタンパク質サブユニット20個あまりからなる巨大な複合体であるため、担体に担持しなくても十分な分子サイズの変化が生じ、これにより蛍光ゆらぎのシグナルが生成したものと考えられる。そしてサイクル4に顕著なシグナルが観察されたことから、標的分子への結合親和性配列の収束がこの段階で起こったことが強く示唆された。

この結果を検証するために、cDNAディスプレイ法での選別工程の各サイクルを次世代シーケンサーで解析することとした。サイクル0～5までの各サイクルの対応付け分子から核酸配列をPCR増幅し、次世代シーケンス解析を行った結果、出現頻度の高い配列が全体に占める割合(100万配列あたりの重複数 RPM) はサイクル4から急激に増大し、サイクル5で最も頻度の高い配列が5.2% (実数 89,422 配列)、2番目に頻度の高い配列が2.2% (実数 37,859 配列) となった。以上の結果から、cDNAディスプレイ

レイ法での選別工程での対応付け分子の収束と本プロジェクトで試作したリアルタイム分析装置のシグナル増加はよく一致することが確認された。

2-3. 医薬候補ペプチドペプチドの獲得

2-3-1 創薬標的分子選定

サポインにおける創薬標的分子選定について、以下に示す考慮事項について、アドバイザーの意見も踏まえて、最も有望な創薬標的となりうる分子を選定した。

【サポイン標的分子に関する考慮事項】

- ・創薬標的としての有効性 (POC)
 - Wnt シグナル伝達経路を標的とする有望な新規抗がん幹細胞剤への応用
- ・ペプチドの特徴 (特異性、膜透過性) が重要となる標的分子
 - 低分子化合物、抗体では取得困難
- ・実験可能性 (標的分子が容易に調達できるか)
 - GST タグ付き β カテニンが市販されている

上記考慮事項を踏まえ、本研究開発では Wnt シグナル系の β カテニンを創薬標的分子として β カテニン結合ペプチド獲得を実施した。以下に β カテニンおよび Wnt シグナルについて記載する。

【 β カテニン】

核内で転写因子と結合して細胞の増殖あるいは発生運命の決定に関与する遺伝子の転写を活性化する機能を有するタンパク

【Wnt シグナル系 (β カテニン経路)】

Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて保存され、初期発生や形態形成、器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動などを制御する。Wnt シグナル経路には、少なくとも 3 種類が存在するが、最もよく知られているのが β -カテニン経路である。近年、 β -カテニンと他の分子との結合部位の立体構造が明らかにされ、複合体特異的阻害剤の選択に有用な情報を提供している。しかし、 β -カテニンは E-カドヘリンや APC、Axin とともに結合し、細胞接着にも関与しており、さらにこれらの分子との結合領域はかなり重複しているため、 β -カテニン/Tcf 複合体を選択的に阻害して、他の β -カテニン複合体に影響しない阻害剤を大規模なスクリーニングから見出す必要がある。

「Wnt シグナルネットワークとその異常による病態 生化学 第 81 巻 第 9 号, pp. 780-792. (2009)」

2-3-2 βカテニン結合ペプチドのセレクション概要

本研究では cDNA ディスプレイ法を用いて βカテニン結合ペプチドのスクリーニングを行った。一連のスクリーニングプロセス概略について図 1 2 に示す。また、βカテニンの固定化試薬としては NHS-SS-Biotin (Pierce) を使用している。

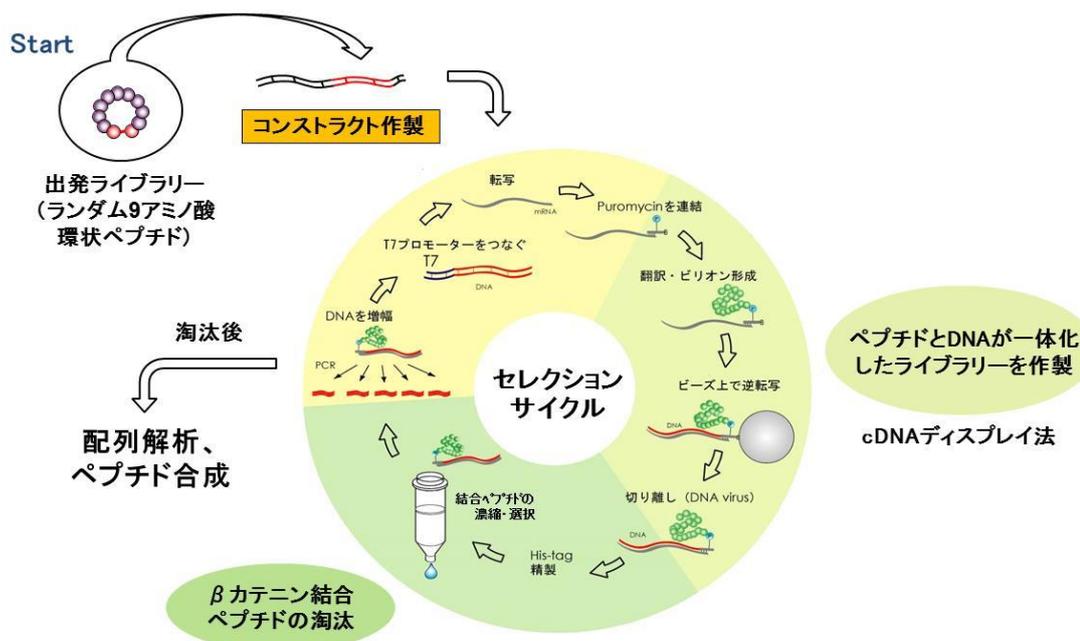


図 1 2 cDNA ディスプレイ法によるセレクションプロセス

2-3-3 βカテニン結合ペプチドのセレクション

環状ペプチドライブラリ (ランダム 9 アミノ酸) と上記で作製した βカテニンを固定化したビーズを用いて、図 1 2 に示すスキームで βカテニン結合ペプチドのスクリーニングを計 4 ラウンド実施した。

また、セレクションプロセスにおいて非特異的吸着ペプチドを減らし、より標的に強く結合するペプチドを獲得するため、セレクションラウンド毎にターゲット量、担体、洗浄条件 (結合時間、施錠回数、溶出方法) を適宜変化させながらセレクションを実施した。

2-3-4 膜透過性ペプチドセレクション

本研究で標的分子として選んだ βカテニンは、細胞内で転写因子 (Tcf や LEF) と複合体を形成することにより転写活性を促進し、遺伝子発現を介して体節や器官の形成を制御する働きをしている。そのため、βカテニンに対する薬剤として用いるために何らかの手法で細胞内に送達する必要がある。

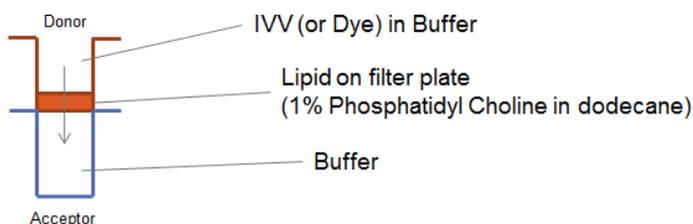
従来、膜を通過しない分子を細胞内に導入するための手法として、マイクロインジェクションや電ポレーションといった機械的あるいは物理的方法、あるいは膜融合性のリポソームやナノ粒子などを用いる方法がとられてきた。しかしながら、これらの方法は細胞に与えるダメージや導入効率といった観点から、必ずしも満足できる方法ではなかった。

一方、ある特定の配列を有するペプチドが、その後ろに様々な物質をつなげた状態でも高い細胞内移行効率を示すことが知られている (CPP:膜透過性ペプチド)。

本研究では膜透過性を示すペプチドを選択的に回収可能とするセレクション系を新たに確立し、前項で実施したβカテニン結合ペプチドと組み合わせることで、βカテニン結合、膜透過性の両方を満たすペプチドの獲得が期待される。さらに、本手法はβカテニンのみならず、特定の細胞に選択性を有する膜透過性ペプチドが獲得できる技術であり、ドラッグデリバリーシステムへの応用などにも応用可能な技術である。

実際の膜透過性ペプチドのセレクションとしては、図13に示すような形で脂質二重膜フィルターを作製し、膜透過性を示す蛍光性色素を用いて、目的の脂質二重膜が作製できていることを確認した。

・脂質二重膜フィルター作製



・膜透過性試験結果 (蛍光性色素透過率)

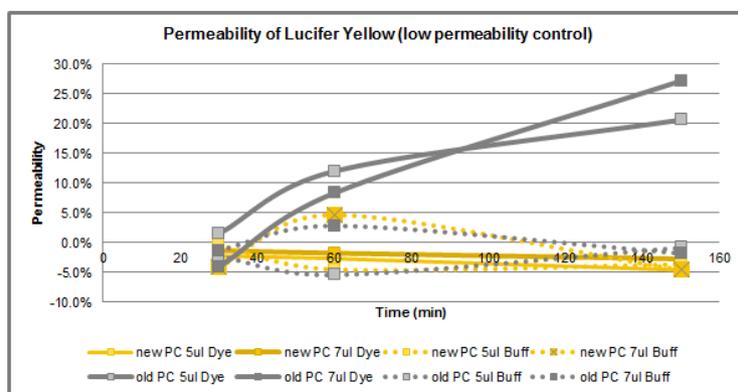


図13 脂質二重膜フィルター作製

図13で作製した脂質二重膜フィルターを用いた膜透過性ペプチドおよびβカテニン結合ペプチドセレクションの流れを図14に示す。最初にラウンド4のセレクション産物由来のcDNAディスプレイライブラリを脂質二重膜フィルターのDonor側に投入する。その後、4時間程インキュベーションする中で、脂質二重膜を透過するペプチドは、Acceptor側に移行すると予想される（透析のイメージ）。インキュベーション後、Acceptor側の溶液を回収することで、その中に膜透過性ペプチドが含まれているものと期待される。

さらに、本実験ではβカテニン結合ペプチドのセレクションも併せて行い、最終的に得られた産物について、PCR増幅、配列解析へと進めていった。

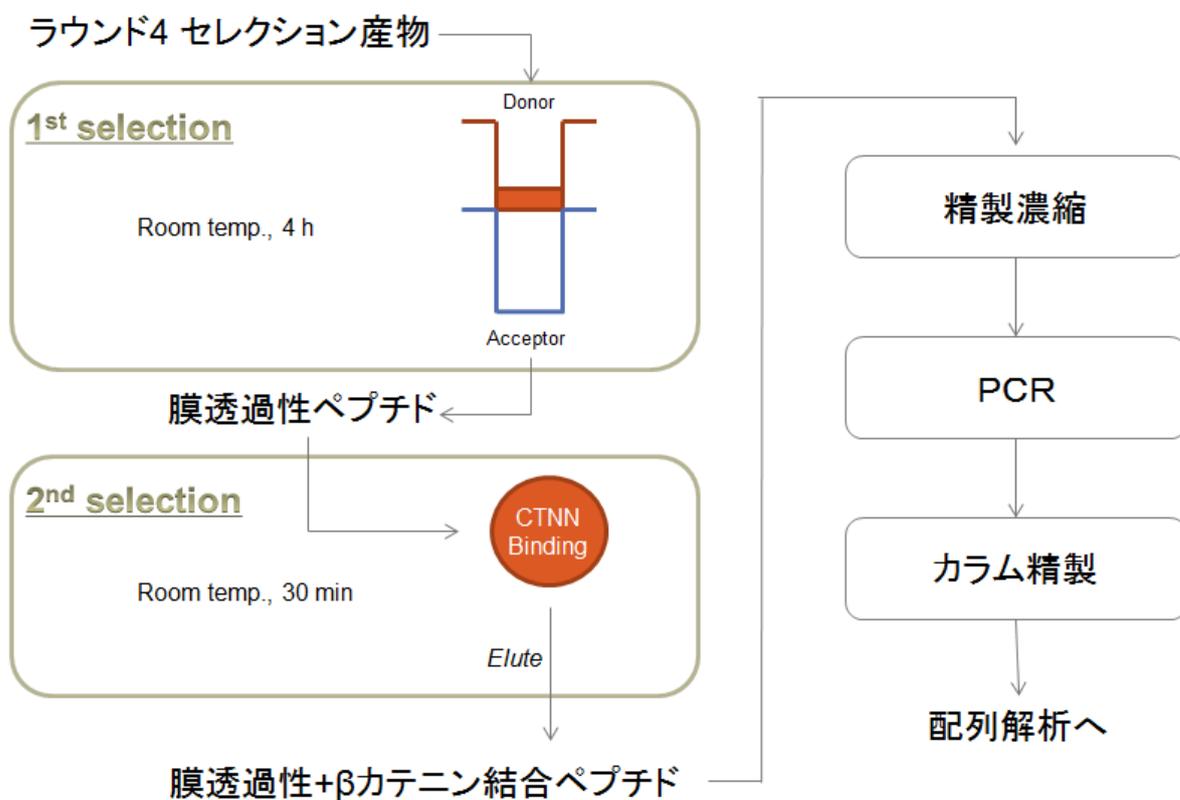


図14 膜透過性およびβカテニン結合ペプチドセレクションスキーム

2-3-5 次世代シーケンシングによる医薬候補ペプチド選定

前項で実施した、膜透過性およびβカテニン結合ペプチドライブラリーに対して、次世代シーケンシングによる大規模配列解析（各ラウンド100万クローン程度）を実施した。

次世代シーケンシングでは、膨大な数のデータが得られるため、そのなかからどのように候補ペプチドを選定するかが課題となり、本研究では候補ペプ

チド選定に関する指標を得ることを目的に、各種解析を実施した。

具体的には各ラウンド毎の出現頻度、ラウンド間の出現頻度上昇率および配列間距離（アミノ酸が異なる割合）などを指標として、より有望と考えられるペプチドを選定した（配列は特許の関係上非公開）。

2-3-6 βカテニン結合ペプチドの合成、プレアッセイ

配列解析の結果選定された候補ペプチドの内、有望なものについて無細胞翻訳系でペプチド合成を行い、それらのペプチドについて、図15に示す手法でβカテニン結合に対する簡易的な結合評価を行った。

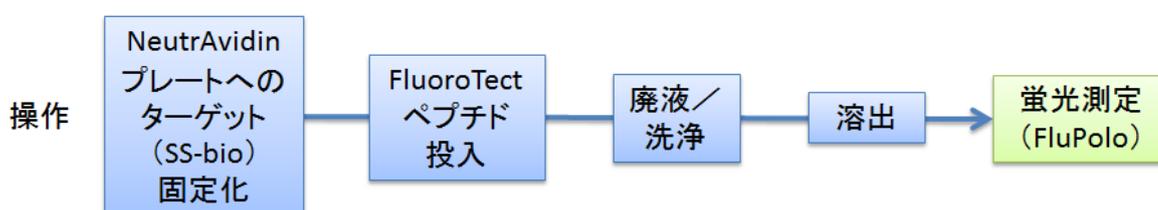


図15 簡易結合評価スキーム

その結果を図16に示す。今回合成、評価したβカテニンペプチドについては、ポジティブコントロール(PAB-IgG)と比較して低い値となっており、結合力としては弱い可能性もあるが、ネガティブコントロールと比較して高い値を示していたペプチドについて、引き続き蛍光相関分光法による詳細な評価を実施した。

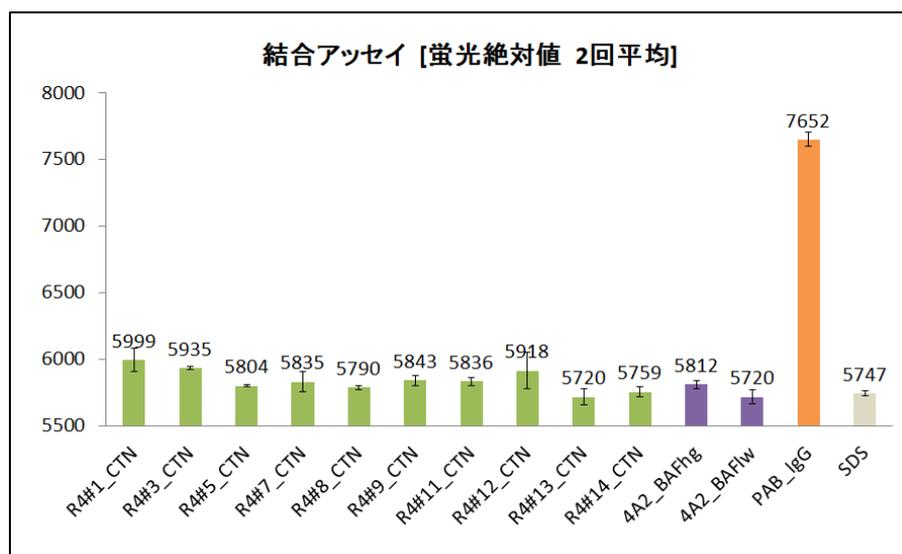


図16 βカテニン結合ペプチドの結合アッセイ

2-3-7 蛍光相関分光法による評価

無細胞翻訳系で合成された蛍光標識ペプチド (R4-peptide) と β -カテニン (リコンビナント、ミリポア社より入手) との相互作用を蛍光相関分光測定装置 (浜松ホトニクス社) で評価した。測定結果を図 17 に示す。

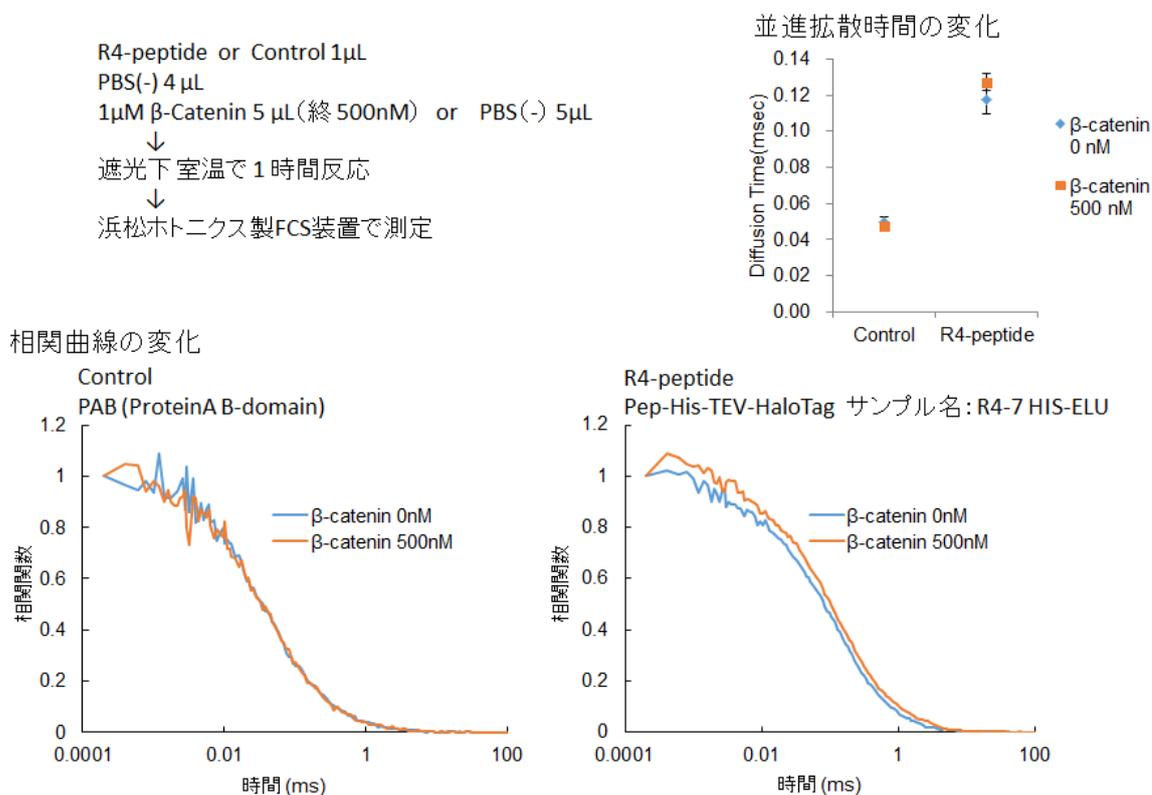


図 17 R4-peptide と β カテニンとの相互作用解析

溶液中の並進拡散時間は蛍光強度変動の時間に対する自己相関解析により求められる。すなわち図 17 中の相関曲線が右にシフトすると並進拡散時間が増加していることを示す。並進拡散時間は複合体の直径に比例して大きくなることから、ペプチドと標的分子が相互作用すれば増加する。測定の結果、ペプチドと β -カテニン (500 nM) を混合することにより相関曲線が右にシフトし、並進拡散時間の増加が認められ、ペプチドと標的分子間にアフィニティー (結合親和性) があることが強く示唆された。一方、対照として測定したペプチド (プロテイン A B ドメイン) は、 β -カテニンの有無により相関曲線になんら変化を示さなかった。並進拡散時間は β -カテニン非存在下の 0.117 ミリ秒から、 β -カテニンを加えることで 0.127 ミリ秒に 1.09 倍増加した。その時に予測される分子量増加は 1.09^3 倍 = 1.3 倍である。実際に期待される分子量増加は 2.9 倍であり、その値と比較するとかなり小さ

い。これは、加えたペプチド中で標的分子に結合している割合が小さいためと考えられる。蛍光標識ペプチドには、無細胞系での発現を可能とするために余分な配列が付加されており、その部分が結合を妨げている可能性がある。今後、化学合成ペプチドを用いて詳細な検討を進める予定である。

第3章 全体総括

3-1 研究開発成果

本研究開発で実施した3つのテーマについて、「1. 環状ペプチドライブラリ」では、様々な種類の環状ペプチドライブラリを高品質(高い環化効率、出現アミノ酸の偏り極小)で作製できることを確認した。

また、「2. ペプチドー標的分子結合のリアルタイム分析装置の実用化」では、蛍光相関分光法に基づいたリアルタイム分析装置の設計・改良(光学系改良並びに候補ペプチド評価応用に向けたソフトウェア改良)およびセレクション応用に向けた各種検討(ビーズ最適化等)を行い、実際にcDNAディスプレイ法によるセレクションにおいて、標的結合ペプチド濃縮確認への応用が可能であることが実証された。

さらに「3. 創薬標的に対する結合ペプチドの獲得」では、創薬標的(β カテニン)結合ペプチドだけでなく、細胞内への送達を視野に入れた膜透過性ペプチドスクリーニング技術および候補ペプチドを効率的に合成、評価する技術の開発も併せて行い、最終的に β カテニンに結合していると考えられるペプチド獲得に成功した。これらの成果を踏まえ、本研究開発の目標は概ね達成したものと判断する。

3-2 今後の課題

これまでの研究内容を踏まえ、研究目標は概ね達成したと判断しているが、今後の事業応用を考えた際に以下の様な補完研究が必要な内容があると考察している。

「ペプチドー標的分子結合のリアルタイム分析装置関連」

補完研究内容：得られた β カテニン結合ペプチドの医薬応用に向けた更なる評価(毒性試験、特異性試験、動物試験等)。また、本研究で高度化された技術を基に β カテニンだけでなく、様々な医薬標的についても、目的のペプチドを獲得し、開発した技術の有効性を実証していく。

「創薬標的に対する結合ペプチド関連」

補完研究内容：サンプル出荷やフィージビリティスタディ等による多くのユーザーニーズの反映、使い勝手、安全性などの最終製品としての開発を行う(期間：1.5年、予算：1,000万円程度)。また、開発されたペプチドの検出システムとしての試薬との適合性向上、判定基準の策定などの開発を適

宜行う予定である。

これら補完研究の実施体制については、現状の体制を維持していく計画であり、AMED、埼玉県プロジェクト等、公的プロジェクトの活用も視野に入れながら早急に実施していく。

3-3 事業化の見通し

本研究開発の成果を踏まえた事業化として、第一に cDNA ディスプレイ法の高度化及び製薬企業の関心が高い創薬標的に対する医薬候補ペプチド創出を行い、それらの成果を基に製薬企業等との共同研究開発を中心とした事業を計画している。

特に、様々な製薬企業と話を行う中で「環状ペプチドライブラリ」を用いた創薬開発に興味を持つ製薬企業が複数あり、環状ペプチドによる創薬開発を目標に、具体的な共同研究に向けた検討が進んでいる。そのような状況を踏まえ、本プロジェクトが終了後、早期に事業化を実現できるよう、精力的に活動を進めて行く計画である。

第二に、本年度の研究で開発した新規ペプチド修飾法とリアルタイム分析装置を基にした「ペプチドの効率的評価装置」について、汎用的な検出システムとして、多検体の処理を行う企業（製薬企業、食品会社、公設試、大学等の研究機関およびマーカー検出や迅速検査を行う企業等）への販売を中心とした事業展開を行っていく計画である。

第三に、本プロジェクトで開発する「ペプチドー標的分子結合のリアルタイム分析装置」は、ペプチドだけでなく、一般的な分子の相互作用（抗原抗体反応など）解析にも適用することが可能であり、その場合も装置の特徴（ノンラベル、固定化不要、高感度、迅速即時測定）を生かした測定が可能なことから、汎用的な検出システムとしての展開が可能である。また、本プロジェクトによって開発される標的分子に特異的に結合する機能性ペプチドを試薬消耗品とした付加価値の高い新規検出キット（検出システム）として、早期の事業化が期待される。