

プロジェクト名：プロテアーゼが関連する難疾患の治療に向けたプロテアーゼ阻害ペプチド開発

プロジェクト代表者：西垣 功一（理工学研究科・教授）

1 はじめに

生体内では、種々のプロテアーゼ（カテプシン D/E、トリプシン、トロンビンなど）が重要な生理的役割を荷っている。これらの酵素の活性異常が様々な障害を引き起こすと考えられ、その働きを正常化する活性調節ペプチドは治療薬として有望な候補となる。しかしこれまでそのようなペプチドを見つけ出すことは容易ではなかった。我々は「高速分子進化技術（eRAPANSY）」を開発し、そのような機能ペプチドを迅速に取得することを可能にした。今回は開発した方法の有効性を実践的に試すこと、及び、その過程で必要となるアッセイ系の検討を行った。

2 方法と結果

今回、新規トリプシン阻害ペプチドの取得のために、開発した淘汰サイクル（図1）を運転し、1次ライブラリー産物として約20%の阻害活性（酵素：基質=1：1；0.2 pM, 37°C, 1時間）を有するオクタマーペプチドを得た（淘汰サイクルの後の多段階操作（クローニング、配列決定、再度のDNAコンストラクト作成、in-vitro ペプチド合成、活性測定など）を成功させる必要があることを考慮すれば、0から始めた実験者が約半年後に手にしたものとしては、まずまずの成果といえる）。この後、2次ライブラリーを作成して、さらに活性の高いペプチドを得ることが残されているが、今回、新たなターゲットプロテアーゼとしてのトリプシンについてもこのシステムで活性ペプチドの取得が実証された意義は小さくない。

一方、これらの進化実験中に取得したペプチドクローンの特性評価は欠かせないが、このために i) ゲルシフト法、ii) SPR 法、iii) ELISA 法の導入・検討を行った。特に、ゲルシフト法においては、蛍光法によって、100ng レベルの試料を用いて、ターゲット分子（ここでは Aβ42 使用）5 μM に対して、1~100 μM 濃度で明瞭なゲルシフトを観察することに成功し、ゲルシフトの実用化に目途をつけた。SPR 法は、解離定数サブnM レベルの強い親和性を持つカテプシンE結合ペプチドのKd測定に成功するなど、使用装置（BIACORE 社クラス 3000）の最高の検出感度を実現した。ELISA 法については、別のプロジェクトとの関係で、ペプチド型 ELISA を開発するなど、これも実用化に成功した。

以上から、本研究テーマのプロテアーゼ阻害ペプチドの開発例として、従来から成功していた、カテプシンEとジンジパイン等のプロテアーゼ以外に、トリプシンでの成功例を付加するとともに、開発環境の整備を進めた。

3 今後の展望

高速分子進化技術の適用例として、トリプシンを用いた「プロテアーゼ阻害ペプチドの創製」が機能したので、引き続き、この技術を他のプロテアーゼに適用し、創薬開発につなげていく。

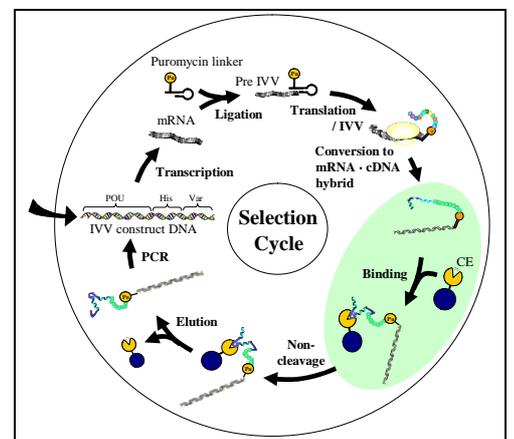


図1. cDNA ディスプレイ法によるペプチドを淘汰するサイクル。図中CEはターゲットのプロテアーゼカテプシン E を示す。本研究ではそれがトリプシンである。