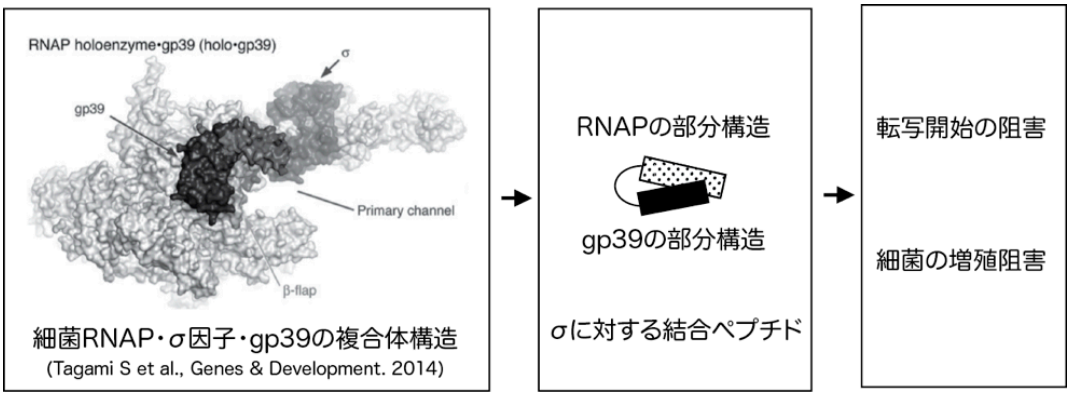
159　細菌の転写阻害因子を模倣した抗菌ペプチドの開発	田上　俊輔

【目的】細菌感染は依然として人類の健康にとって重大なリスクであるが、近年抗生物質の開発ペースは低下してきており、迅速に抗生物質を開発する新たな手法の確立が望まれる。現在までに開発されてきた抗生物質のほとんどは低分子化合物であるが、低分子化合物の改良を化学的手法によって行おうとすれば、そのハイスループット性には限界がある。そこで、本研究では分子生物学的な手法によってハイスループットに改変可能なペプチドを用いることによって、新規抗生物質の獲得を試みる。ペプチドはリボソームによる翻訳系を用いることにより非常に大きなライブラリーの作製が可能であり、新たな医薬品開発のシードとして注目されている。しかし、実際にはランダムな配列を持つペプチドライブラリーを用いると機能を持つペプチドの割合が低く、機能性ペプチドのセレクションにはしばしば困難を伴う。そこで本研究では、細胞内で働くタンパク質の部分構造を元にペプチドライブラリーを作製することで、効率の良い抗菌ペプチド開発に挑んだ。

【方法】細菌の転写機構はリファンピシンなどの代表的な抗生物質の標的である。そこで本研究では、細菌の転写阻害タンパク質 gp39 の作用機構を模倣することで、効率的な抗菌ペプチド開発を目指した。そのため、gp39 の部分構造を元にしたペプチドライブラリーを mRNA ディスプレイ法を用いて作製し、細菌の転写開始因子（σ 因子）に強固に結合するペプチドのスクリーニングを行った。

【結果】gp39 の部分構造を元にしたペプチドライブラリーから σ 因子に結合するペプチド（K_D 20 nM 程度）を効率よくスクリーニングすることができた。今後スクリーニングされたペプチドによる細菌の転写・増殖阻害実験を行っていく予定である。

細菌の転写阻害因子を模倣した抗菌ペプチドの開発



159. 細菌の転写阻害因子を模倣した抗菌ペプチドの開発

田上　俊輔

*理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
分子ネットワーク制御因子開発ユニット

Key words：抗菌ペプチド，転写阻害，ペプチドスクリーニング，mRNA ディスプレイ，構造生物学

緒　言

細菌感染は依然として人類の健康にとって重大なリスクであるが、近年抗生物質の開発ペースは低下してきており、迅速に抗生物質を開発する新たな手法の確立が望まれる。現在までに開発されてきた抗生物質のほとんどは低分子化合物であるが、低分子化合物の改良を化学的手法によって行おうとすれば、そのハイスループット性には限界がある。そこで、本研究では分子生物学的な手法によってハイスループットに改変可能なペプチドを用いることによって、新規抗生物質の獲得を試みる。ペプチドはリボソームによる翻訳系を用いることにより非常に大きなライブラリーの作製が可能であり、新たな医薬品開発のシードとして注目されている［1］。しかし、実際にはランダムな配列を持つペプチドライブラリーを用いると機能を持つペプチドの割合が低く、機能性ペプチドのセレクションにはしばしば困難を伴う。そこで本研究では、細胞内で働くタンパク質の部分構造を元にペプチドライブラリーを作製することで、効率の良い抗菌ペプチド開発に挑んだ。

細菌 RNA ポリメラーゼは細菌の増殖に必須の酵素であり、リファンピシンなどのいくつかの代表的な抗生物質の標的分子である。また、最近でも RNA ポリメラーゼを標的とする新たな抗生物質の発見が報告されており［2］、今後も細菌 RNA ポリメラーゼを抗生物質開発の標的に選ぶことは合理的であると言える。我々はこれまでの研究で、転写制御タンパク質による細菌 RNA ポリメラーゼの活性阻害機構を X 線結晶構造解析を用いて明らかにしてきた［3，4］。そこで本研究では、これらの転写阻害タンパク質のうち gp39 の部分構造・作用機構を模倣することで、効率的な抗菌ペプチド開発を目指した。gp39 の部分構造を元にしたペプチドライブラリーを mRNA ディスプレイ法を用いて作製し、細菌の転写開始因子（σ因子）に強固に結合するペプチドのスクリーニングを行ったところ、σ因子に結合するペプチド（K_D 20 nM 程度）を効率よくスクリーニングすることができた。今後スクリーニングされたペプチドによる細菌の転写・増殖阻害実験を行っていく予定である。

方法および結果

1.　バクテリオファージ由来のタンパク質を模倣した転写阻害ペプチドのデザイン

RNA ポリメラーゼ（RNAP）は細胞の遺伝子発現を担う酵素で、その活性は細胞の増殖に必須である。そのため、細菌の RNAP は様々な抗生物質の標的にもなっている。細菌の転写では、まず RNAP（図 1A）が転写開始因子σ（図 1B）と結合してホロ酵素を形成する（図 1C）。さらに、このホロ酵素上でσ因子の領域 2（σ2）と領域 4（σ4）がそれぞれプロモーターの−10 領域と−35 領域を認識すると（図 1D）、RNA 合成が開始される。Thermus thermophilus に感染するバクテリオファージ P23〜45 由来のタンパク質 gp39 は、ホロ酵素上でσ4 と RNAP 本体の 2 箇所に結合することによって、σ4 を大きく移動させる（図 1E）。これによってホロ酵素はプロモーターを正しく認識できなくなり、宿主の遺伝子の転写が阻害される［4］。

我々が解明した RNAP ホロ酵素・gp39 複合体の結晶構造では（図 1H、PDB: 3WOD）、①σ4、②gp39 c-helix、③RNAP β-flap tip の 3 要素が相互作用していた。そこで、仮に gp39 c-helix と β-flap tip を連結し、相対位置を調整・固定することが出来れば（図 1F）、σ4 に強固に結合するペプチドを開発出来ると考えられる（図 1G）。本研究では、

*現在の所属：理化学研究所 生命機能科学研究センター 高分子生体高分子開発ユニット

このようなσ4結合ペプチドを開発し、σ4とRNAPの結合を阻害することで、細菌の増殖阻害を試みることにした。

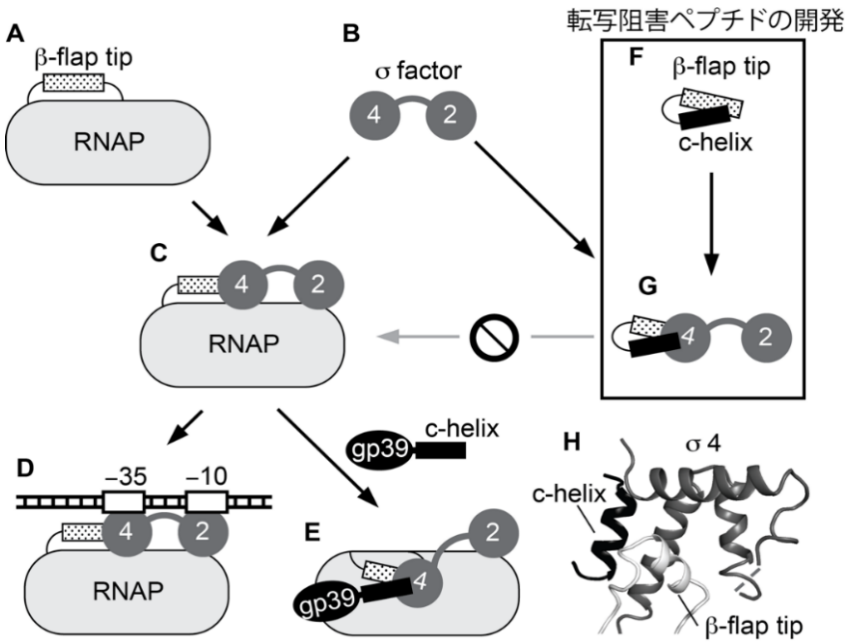


図1. 細菌の転写開始制御と阻害ペプチドの開発

A～D）通常のσ因子による転写開始

E） gp39による転写開始阻害

F～G） gp39を模倣した転写阻害ペプチドのデザイン

H） RNAPホロ酵素・gp39複合体の結晶構造（PDB：3WOD）

2. σ4を標的としたmRNAディスプレイ法の確立

本研究ではmRNAディスプレイ法［5，6］を用いて新規抗菌ペプチドの探索をおこなう。mRNAディスプレイ法では、まずペプチドライブラリーをコードしたDNA（図2A）を*in vitro*転写し、さらにmRNAの3’末端にピューロマイシンを付加する（図2B）。このmRNAを無細胞翻訳系で翻訳すると、ピューロマイシンと翻訳されたペプチドのC末端が結合し、mRNA-ペプチド複合体が作られる（図2C）。このmRNA-ペプチド複合体を標的分子が付加された磁気ビーズへの吸着によって選択すれば（図2D）、標的分子に結合するペプチドとそれをコードするmRNAが回収できる。更にmRNAの配列をRT-PCRによって増幅して、ディスプレイの工程を繰り返すことで、より強固な結合能をもつペプチドを選択する。本研究では、ライブラリーとしてgp39 c-helixとRNAP β-flap tipをランダム配列リンカー（10アミノ酸程度）を準備して、σ4を付加した磁気ビーズへの吸着によって、σ4に強固に結合するペプチドを試みた。

mRNAディスプレイ法によるmRNA-ペプチド複合体の形成効率は発現させるペプチドやmRNAの配列にも依存する。そこで、本研究でもまずc-helix・β-flap tip融合ペプチドライブラリーの配列調整（タグの位置変更等）を行った。その結果、十分なmRNA-ペプチド複合体形成効率 （10%程度）のmRNAディスプレイ系を立ち上げることが出来た。さらに、T. thermophilus σ4を付加した磁気ビーズを用いて、予備的なペプチド選択実験を行ったところ、ペプチドを含まないmRNAのみを加えた場合でも大量のmRNA（投入量の数%）がビーズに結合してしまうことが分かった。これは、核酸結合タンパク質であるσ4とmRNAとの不特異的な相互作用によると考えられた。そこで、実験系にヘパリンを加えたところ、非特異的RNA回収を0.0001%程度に抑えることが出来き（表1、Round 1、negative control）、σ4結合ペプチド選択実験が可能になった。

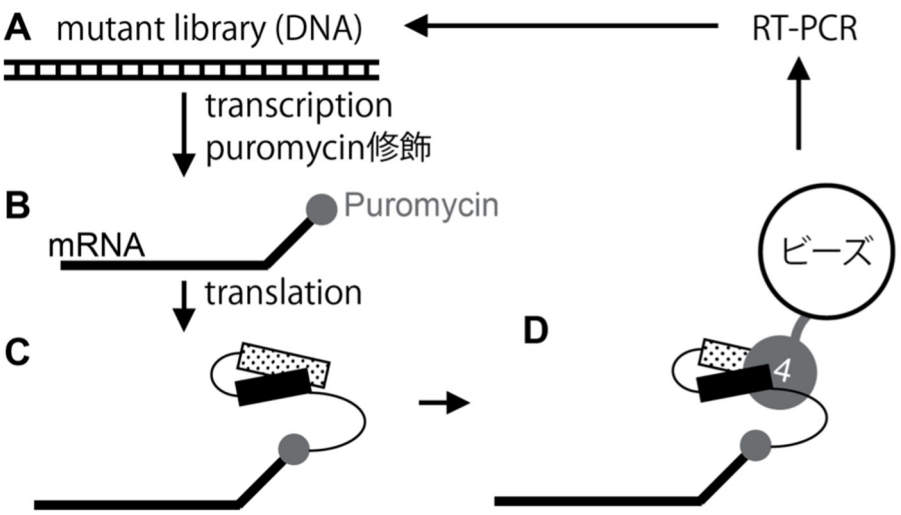


図 2. mRNA ディスプレイ法を用いた σ 4 結合ペプチドのセレクション

A) ペプチドライブラリーをコードした DNA の *in vitro* 転写

B) mRNA3’末端のピューロマイシン修飾

C) gp39 を模倣した転写阻害ペプチドのデザイン

D) RNAP ホロ酵素・gp39 複合体の結晶構造（PDB：3WOD）

確立させたプロトコルを用いて、2 ラウンドにわたるペプチド選択実験を行った。第 1 ラウンド目では 0.001%程度だった mRNA-ペプチド複合体の回収率が第 2 ラウンドでは約 30 倍（0.03%）に上昇した（表 1、Round 1、 2、selection）。この間、非特異的な結合の上昇などは見られず（表 1、Round 1、2、 negative control）、σ 4 結合ペプチドが効率よく選択されていることが確認できた。通常のペプチド選択実験で初期ラウンドからこれほど効率よく結合ペプチドが回収されることは少ない。よって、RNAP ホロ酵素・gp39 複合体の結晶構造によって解明された天然の結合様式を模倣することで、合理的な σ 4 結合ペプチドライブラリーのデザインに成功したと言える。現在までに、さらにセレクションを進め、いくつかの σ 4 結合ペプチドペプチドに成功している（K_D 約 20 nM）。

Round	Input	beads	Recovery
1 (negative control)	RNA	Sigma 4	0.00013%
1 (selection)	RNA-Peptide	Sigma 4	0.0011%
2 (negative control)	RNA	Sigma 4	0.00008%
2 (selection)	RNA-Peptide	Sigma 4	0.032%

表 1. 4 結合ペプチドのセレクション

考　察

本研究では、天然の転写調節因子の構造を模倣することで、効率的に標的結合ペプチドを選択することが出来た。今後、選択されてきたペプチドの RNA ポリメラーゼ阻害活性を調べる予定である。また得られた転写阻害ペプチドと RNA ポリメラーゼの標的部位の X 線結晶構造解析を行い、ペプチドと標的の相互作用様式を確認する。構造情報をもとに新たなペプチド変異体ライブラリー作製することで、さらに抗菌ペプチドの性能を効率的に高めることが出来ると期待される。

また、今後は今回得られたペプチドを改良することで様々な細菌種を標的にした転写阻害ペプチドの開発を計画している。ペプチドは通常の低分子抗生物質に比べてサイズが大きく、標的との接触面積も大きくなることから、高い標的特異性をもたせることが出来ると考えられる。そこで、細菌の種ごとに特異的な抗菌ペプチドを開発することが出来れば、人体に共生する有用な細菌群には影響を与えずに、標的の細菌のみを死滅させる抗菌ペプチドも開発できると考えられる。皮膚や腸内の細菌群の健康に及ぼす影響の高さが昨今注目されており、種特異性の高い抗生物質の需要は今後高まると考えられる。RNAポリメラーゼやσ因子は全ての細菌で保存されているが、表面のアミノ酸はそれぞれに少しずつ異なる。このため、ある種の細菌に特異的なペプチドを作製することは可能である。なおかつ、一度ある細菌に作用するペプチドを開発すれば、それを改変することによって別種の細菌に作用するペプチドを迅速に取得できると考えられる。よって、本研究のアプローチによって高効率な抗生物質開発が可能になると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 分子ネットワーク制御因子開発ユニットの Kim Huynh Nhat 博士である。

文　献

1) Wada A. Development of Next-Generation Peptide Binders Using In vitro Display Technologies and Their Potential Applications. Front Immunol. 2013 Aug 1;4:224. doi: 10.3389/fimmu.2013.00224.
2) Maffioli SI, Zhang Y, Degen D, Carzaniga T, Del Gatto G, Serina S, Monciardini P, Mazzetti C, Guglierame P, Candiani G, Chiriac AI, Facchetti G, Kaltofen P, Sahl HG, Dehò G, Donadio S, Ebright RH. Antibacterial Nucleoside-Analog Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase. Cell. 2017 Jun 15;169(7):1240-1248.e23. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.042.
3) Tagami S, Sekine S, Kumarevel T, Hino N, Murayama Y, Kamegamori S, Yamamoto M, Sakamoto K, Yokoyama S. Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. Nature. 2010 Dec 16;468(7326):978-82. doi: 10.1038/nature09573.
4) Tagami S, Sekine S, Minakhin L, Esyunina D, Akasaka R, Shirouzu M, Kulbachinskiy A, Severinov K, Yokoyama S. Structural basis for promoter specificity switching of RNA polymerase by a phage factor. Genes Dev. 2014 Mar 1;28(5):521-31. doi: 10.1101/gad.233916.113.
5) Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. FEBS Lett. 1997 Sep 8;414(2):405-8. doi: 10.1016/s0014-5793(97)01026-0
6) Roberts RW1, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12297-302. doi: 10.1073/pnas.94.23.12297