

課題番号 4 1

制御性免疫受容体のリガンド創生に関する研究

[1] 組織

代表者：久保 泰

(産業技術総合研究所)

対応者：高井 俊行

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

葛西 航 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

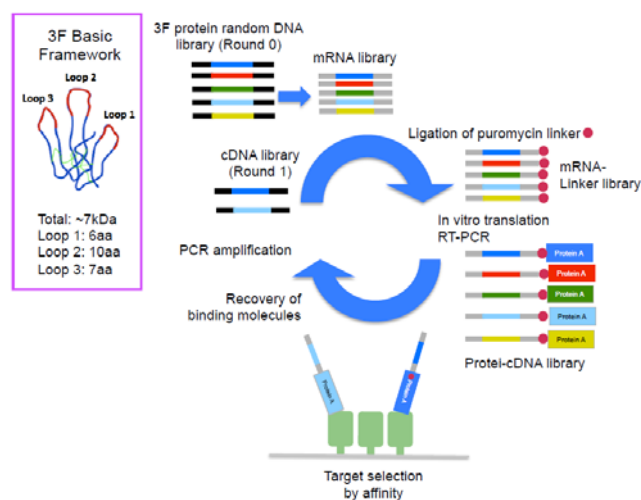
抗炎症薬の開発においては、免疫応答の活性化に関わる受容体の阻害剤の探索・開発が主流となっている。一方、現状では高額な抗体医薬を除き、中低分子化合物では十分な効果を発揮するものが得られていない。本共同研究では、免疫応答の活性化経路ではなく抑制的に調節する経路に着目し、それにかかわる機能分子を賦活化する分子（抑制シグナル賦活化分子）を単離し、その特性解析や構造活性相関解析から創薬基盤研究に資することを目指した。

そのために、産総研が保有する天然のペプチド骨格を用いたランダムペプチドライブラリから特定の分子を標的として特異的に結合するペプチドを選択する指向的分子進化技術と、東北大が世界をリードする免疫抑制系シグナル伝達経路に関する高い研究ポテンシャルのマッチングにより研究を推進した。具体的には、Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor (LILR) B1 を標的分子とし、ランダム配列を 3 次元的に提示することができる 3 本指型分子骨格 (3F Basic Framework) を鋳型とするペプチドライブラリから試験管内進化法により探索した (図)。

以下、共同研究の活動状況は次のとおりである。

- (1) 本共同研究に先行して締結していた東北大・産総研共同研究契約 (2013 年 6 月) に基づく共同研究に続き、産総研が保有する分子進化工学技術を高井研究室に導入するために研究員及び学生の産総研への派遣、試料提供、技術相談を行った。
- (2) 2015 年 8 月及び 2016 年 2 月 産総研研究者が高井研究室を訪問し相互の研究進捗の確認と研究打ち合わせを行った。

- (3) 研究の進捗を勘案しながら、中～大型の資金提供型予算 (AMED、JST A-STEP) への研究申請を共同で行った。また、東北大産総研マッチング研究支援事業に共同提案し採択された。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

- (1) **Random triplet codon の最適化**：探索の始発物質となるランダムペプチドライブラリの作製において連続するランダム配列部分で発生する **termination codon** の出現は、不可避ながらその頻度をできるだけ低くする条件を検討した。その結果、**triplet codon** において $NNN \Rightarrow NNS \Rightarrow NNB$ へ順次改変した結果 **termination codon** 出現確率の少ない良質なライブラリを作製できるようになった。
- (2) **Target-conjugated beads の最適化**：標的分子を固定化する担体の物理化学的性質により、回収率に差が出ることが判明した。疎水性、小粒子径の磁気ビーズから親水性、大粒子径のビーズへの変更により回収率が改善することが判明した。
- (3) **Linker ligation: 3-finger (3F) library** をコードする mRNA とピューロマイシン linker との ligation 条件を最適化した。
- (4) **His-tag affinity resin**: His-tag 精製は 3F

cDNA library から転写・翻訳により 3F タンパク質をコードする領域から C 末端側の His-tag までの full length を翻訳できた分子種を選択するために必要である。His-tag に対して Co affinity beads を使用することにより、Ni-NTA affinity beads と比較してその選択性が向上することが判明した。

- (5) His-tag selection condition: Co affinity beads による選択においてイミダゾールによる wash 及び elution 条件の至適化に成功した。
- (6) Selection cycle を重ねた結果、複数の 3F 型ペプチドの候補配列を選択した。標的分子に対するこれらのペプチドの結合親和性及び免疫応答に対する生理活性については、現在解析を進めている。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究を通じて、東北大学と産業技術相互研究所の学生と研究者との交流が活発に行われた。特に学生にとっては、免疫学の基盤研究を進める中で創薬を意識した研究展開のマインドを涵養することができたと思われる。

本研究課題で得られた標的受容体特異的ペプチドが受容体アゴニスト様活性を持つことを示すことができれば、従来からの促進性のシグナル伝達の阻害薬に加えて、抑制シグナルの賦活化により免疫応答をコントロールするという新たな創薬コンセプトの有効性を証明することになる。これにより創薬プラットフォームを拡大し、新薬開発の加速を促すことが期待される。

本共同研究で得られた知見を基に、AMED「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」や JST A-STEP などの実用化を視野に入れた中・大型研究提案や製薬企業が募集する課題型研究募集に応募する準備を進めている。

[4] 成果資料

論文未発表