明　細　書

発明の名称 ：

環状ペプチドをタンパク質構造に提示させる超汎用法

技術分野

[0001] 本発明は、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に提示する方法等に関する。

背景技術

[0002] タンパク質の活性を向上させることを目的として、タンパク質のアミノ酸残基を改変するか、タンパク質に別のペプチド構造を導入する技術が知られている。

特許文献１には、生物活性を上昇させた、生物活性異種ペプチド配列を内部に挿入して有する血清アルブミンタンパク質を含んで成るキメラポリペプチドが開示されている。

特許文献２には、ＦｎＩＩＩベースポリペプチドの少なくとも１つのループ領域の改変に加えて、ＦｎＩＩＩポリペプチドのβシートの改変が、ＦｎＩＩＩベース結合分子とターゲット分子との結合能力を改善することが開示されている。

[0003] また、特許文献３には、１個以上の生物活性ペプチドを抗体タンパク質のＦｃドメインに組み込んだ分子が開示されているが、具体的には、Ｆｃドメインのループ領域における隣接したアミノ酸残基に対して生物活性ペプチドが挿入されている。

特許文献４には、特許文献３同様に、修飾されたＦｃ分子が記載されているが、抱合部位のアミノ酸残基の側鎖を通じて共有結合された付加機能部分を有するＦｃ分子が開示され、具体的には、抱合部位のアミノ酸残基がシステイン残基であることが開示されている。

[0004] 加えて、特許文献５及び６には、免疫グロブリンの構造ループを１カ所以上改変して新たな結合能を免疫ブロブリンに賦与する技術が開示されている

。

[0005] 特許文献２においては、ＦｎＩＩＩのループ構造部分にランダム化したペプチド配列を挿入したライブラリーから標的への結合活性種を獲得している。

また、特許文献５及び６においても、既得のペプチドを挿入するのではなく、ランダム化したペプチド配列を免疫グロブリンの特定の構造ループの１カ所に挿入し、そのライブラリーから標的への結合活性を有する活性種をスクリーニングしている。

すなわち、これらの従来技術においては、単なるランダム化されたペプチドが挿入されたライブラリーを得ているに過ぎず、ライブラリーのスクリーニングにより、挿入されたことが同定されたペプチド部分について、それらペプチド単独で標的への結合活性を維持できるか不明である。言い換えれば、挿入されたペプチドは、ライブラリー化するために挿入されている配列であって、そもそも結合活性を有することが期待されていない。また、タンパク質の互換性、例えば免疫グロブリンで提示されているペプチドをＦｎＩＩＩに再挿入しても元の活性を維持できるか不明である。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表２００５－５０５２４３号公報

特許文献2：特表２０１３－５３９３６２号公報

特許文献3：特表２００８－５１４２０１号公報

特許文献4：特表２００９－５０４１６４号公報

特許文献5：特表２００９－５４１３６１号公報

特許文献6：特表２００９－５４０８３７号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明が解決しようとする課題は、ループ構造を有するタンパク質を足場

として、環状ペプチドが有する構造と活性を保持させた状態で、環状ペプチドを、タンパク質上に提示する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、以下のとおりである。

（１）

環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に提示する方法であって、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えることにより、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させることを含む、方法。

（２）

ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が、４～７Åの範囲内にある、（１）に記載の方法。

（３）

ループ構造を有するタンパク質が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基の間に１～１５アミノ酸残基を有する、（１）又は（２）に記載の方法。

（４）

環状ペプチドが、タンパク質性アミノ酸及び／又は非タンパク質性アミノ酸からなる、（１）～（３）のいずれかに記載の方法。

（５）

化学架橋構造が、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を含む、（１）～（４）のいずれかに記載の方法。

（６）

２以上の環状ペプチドが、複数のループ構造を有するタンパク質の異なるループ構造にそれぞれ融合する、（１）～（５）のいずれかに記載の方法。

（７）

２以上の環状ペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、（６）に記載の方法。

（８）

２以上の環状ペプチドが、異なるアミノ酸配列を有する、（６）に記載の方法。

（９）

環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える際に、リンカー配列を介して環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、（１）～（８）のいずれかに記載の方法。

（１０）

ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んで、環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、（１）～（９）のいずれかに記載の方法。

（１１）

環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させて環状ペプチドをタンパク質上に提示させた改変タンパク質の製造方法であって、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドのアミノ酸配列から、タンパク質上に提示させる部分アミノ酸配列を選択し、該部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を選択し、

ループ構造を有するタンパク質のループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に相当する塩基配列を選択し、該選択された塩基配列間に存在する塩基を必要に応じて削除し、選択された環状ペプチドの部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を挿入して組み込んだ塩基配列を有する核酸を準備し、

該核酸を翻訳する、改変タンパク質の製造方法。

（１２）

ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が、４～７Å

の範囲内にある、（１１）に記載の方法。

（１３）

ループ構造を有するタンパク質が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基の間に１～１５アミノ酸残基を有する、（１１）又は（１２）に記載の方法。

（１４）

環状ペプチドが、タンパク質性アミノ酸及び／又は非タンパク質性アミノ酸からなる、（１１）～（１３）のいずれかに記載の方法。

（１５）

化学架橋構造が、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を含む、（１１）～（１４）のいずれかに記載の方法。

（１６）

２以上の環状ペプチドが、複数のループ構造を有するタンパク質の異なるループ構造にそれぞれ融合する、（１１）～（１５）のいずれかに記載の方法。

（１７）

２以上の環状ペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、（１６）に記載の方法。

（１８）

２以上の環状ペプチドが、異なるアミノ酸配列を有する、（１６）に記載の方法。

（１９）

環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える際に、リンカー配列を介して環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、（１１）～（１８）のいずれかに記載の方法。

（２０）

ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ

酸配列を含んで、環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、（１１）～（１９）のいずれかに記載の方法。

（２１）

（１１）～（２０）のいずれかに記載の製造方法により得られる改変タンパク質。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、ループ構造を有するタンパク質を足場として、環状ペプチドが有する構造と活性を保持させた状態で、環状ペプチドを、タンパク質上に提示する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例で用いた環状ペプチドの構造を示す。環状ペプチドを示す一般式において、ＳはＣｙｓのチオール基に由来する硫黄原子を意味する。Ｘａａは任意のアミノ酸を示し、ｓは任意の０以上の整数である。Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）は、一文字標記により、環状ペプチドの内部構造を構成するアミノ酸配列を示し、小文字で示したアミノ酸（ｗ、ｙなど）はそれぞれ、Ｄ体のアミノ酸（Ｄ－Ｔｒｐ、Ｄ－Ｔｙｒ）を示す。

[図2]足場タンパク質として用いたフィブロネクチンの第１０Ｔｙｐｅ　ＩＩＩリピートドメインの立体構造を示す。第１０Ｔｙｐｅ　ＩＩＩリピートドメインにおけるループ構造は、Ｖａｌ１４９０をB_Nとし、Ｓｅｒ１４９９をB_Cとして、その間の８アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図3]足場タンパク質として、ヒトフィブロネクチンの第１０Ｔｙｐｅ　ＩＩＩリピートドメインを用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｖａｌ１４９０（B_N）とＳｅｒ１４９９（B_C）の間の配列が挿入配列を示す。挿入配列中、ＴＧＲとＳＰＡは、ヒトフィブロネクチンの第１０Ｔｙｐｅ　ＩＩＩリピートドメインに由来するアミノ酸配列を示し、下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図4]Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたＦｎ１０－Ｆｃ及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。

[図5]環状ペプチド融合タンパク質（Ｆｎ１０－Ｆｃ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図6]足場タンパク質として用いたヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域の立体構造を示す。ヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域におけるループ構造は、それぞれ、Ｌ１サイト～Ｌ８サイトとして示すとおり、各サイトにおいて、B_Nとして示されるアミノ酸残基と、B_Cとして示されるアミノ酸残基と、その間にそれぞれ存在する１～３アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図7]足場タンパク質として、ヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域を用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｆｃ領域のヒンジ領域に近い「上部」のＬ１～Ｌ３サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ１～Ｌ３サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図8]足場タンパク質として、ヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域を用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｆｃ領域の「底部」のＬ４～Ｌ６サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ４～Ｌ６サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図9]足場タンパク質として、ヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域を用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｆｃ領域の「側面部」のＬ７～Ｌ８サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ７～Ｌ８サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図10]Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたＦｃ及びその環状ペプチ

ド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。

[図11]環状ペプチド融合タンパク質（Ｆｃ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図12]足場タンパク質として用いたヒトＩｇＧ全体の立体構造を示す。融合に用いるＦｃ領域におけるループ構造は図６～図９に示したＬ１サイト～Ｌ８サイトであるが、ここではそれぞれの位置を、図６においてB_N、B_Cとして示したアミノ酸残基の中間点として表現した。

[図13]図１３Ａは、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたＩｇＧ及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。図１３Ｂは、環状ペプチド融合タンパク質（ＩｇＧ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図14]足場タンパク質として用いたヒト血清アルブミンの立体構造を示す。ヒト血清アルブミンにおけるループ構造は、それぞれ、Ｌ１～Ｌ４サイトとして示すとおり、各サイトにおいて、B_Nとして示されるアミノ酸残基と、B_Cとして示されるアミノ酸残基と、その間にそれぞれ存在する２又は４アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図15]足場タンパク質として、ヒト血清アルブミンを用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｌ１～Ｌ４サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ１～Ｌ４サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図16]Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたＨＳＡ及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。

[図17]環状ペプチド融合タンパク質（ＨＳＡ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図18]足場タンパク質として用いたヒト成長ホルモンの立体構造を示す。ヒト成長ホルモンにおけるループ構造は、それぞれ、Ｌ１～Ｌ２サイトとして示すとおり、各サイトにおいて、B_Nとして示されるアミノ酸残基と、B_Cとし

て示されるアミノ酸残基と、その間にそれぞれ存在する１アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図19]足場タンパク質として、ヒト成長ホルモンを用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｌ１～Ｌ２サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ１～Ｌ２サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図20]図２０Ａは、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたｈＧＨ及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。図２０Ｂは、環状ペプチド融合タンパク質（ｈＧＨ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図21]足場タンパク質として用いたヒト血清レチノール結合タンパク質の立体構造を示す。ヒト血清レチノール結合タンパク質におけるループ構造は、それぞれ、Ｌ１～Ｌ２サイトとして示すとおり、各サイトにおいて、B_Nとして示されるアミノ酸残基と、B_Cとして示されるアミノ酸残基と、その間にそれぞれ存在する２アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図22]足場タンパク質として、ヒト血清レチノール結合タンパク質を用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。Ｌ１～Ｌ２サイトにおける環状ペプチドが融合した融合タンパク質をそれぞれＬ１～Ｌ２サイト変異体として示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図23]図２３Ａは、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたヒト血清レチノール結合タンパク質（ＲＢＰ）及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。図２３Ｂは、環状ペプチド融合タンパク質（ＲＢＰ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図24]足場タンパク質として用いたヒト胎盤アルカリフォスファターゼの立体構造を示す。ヒト胎盤アルカリフォスファターゼにおけるループ構造は、

各サイトにおいて、Ｌｙｓ４０２をB_Nとし、Ｇｌｙ４０４をB_Cとして、その間の１アミノ酸残基のループ領域とからなる。

[図25]足場タンパク質として、ヒト胎盤アルカリフォスファターゼを用いた場合の融合タンパク質における部分構造である、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を示す。下線部分は環状ペプチドに由来するアミノ酸配列を示し、灰色文字はリンカー配列を示す。

[図26]Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌させたヒト胎盤アルカリフォスファターゼ（ＰＬＡＰ）及びその環状ペプチド融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥを示す。

[図27]環状ペプチド融合タンパク質（ＰＬＡＰ変異体）と結合分子との相互作用結果を示す。

[図28]ｍＰ６－９ペプチド融合タンパク質（Ｆｃ変異体）によるプレキシンＢ１シグナル伝達の阻害効果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明を、発明を実施するための形態により具体的に説明するが、本発明は、以下の発明を実施するための形態に限定されるものではなく、種々変形して実施することができる。

[0012] 本発明は、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に提示する方法であって、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えることにより、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させることを含む、方法である。

本発明によれば、ループ構造を有するタンパク質を足場として、環状ペプチドが有する構造と活性を保持させた状態で、環状ペプチドを、タンパク質上に提示することができる。また、環状ペプチドを、タンパク質上に提示することにより、環状ペプチドは、タンパク質を足場とすることにより、生体適合性が増す、また、タンパク質が有する機能を環状ペプチドに賦与するこ

とができるといった利点がある。

本発明においては、環状ペプチドは、その部分構造がタンパク質のループ構造と置き換わる形式で、タンパク質上に提示される。また、好適には、環状ペプチドのループ構造と置き換わる部分構造が、活性、より具体的には、生理活性を示すための構造である。また、構造面からは、好適には、環状ペプチドのループ構造と置き換わる部分構造が、環状ペプチドの分子内環状構造を構成しているアミノ酸配列から選択される。

本発明により、環状ペプチドと、タンパク質に限定を加えることなく、環状ペプチドをタンパク質構造に、すなわち、タンパク質上に提示させる超汎用法を提供することができる。

[0013] 環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有しているように、化学架橋構造により環状構造を有するペプチドであるが、化学架橋構造を、タンパク質のループ構造に代替することにより、すなわち、ペプチドを環状化するにあたってこれまで使ってきた化学架橋構造にかわり、さも一分子と捉えたタンパク質を用いるという技術思想を有する点に、本発明は特徴を有する。

とはいえ、環状ペプチドとループ構造を有するタンパク質とを融合させた改変タンパク質におけるアミノ酸配列の一次構造自体は環状化しているものではない。そして、改変タンパク質における環状ペプチドに由来する構造が、見かけ上、もともと存在していた環状ペプチドにおける環状構造とは全体でみると異なる形状でありながら、局所的にはペプチドの３次元構造は維持され、かつ、環状ペプチドの活性を維持できるものである。

本発明の効果として、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に、環状ペプチドの構造を保持させた状態で提示することは、間接的に、ループ構造を有するタンパク質上に環状ペプチドを融合させた改変タンパク質における環状ペプチドが本来有する活性を保持していることにより確認することができる。すなわち、本発明においては、環状ペプチドが有する活性が、改変タンパク質においても発揮されることで、ループ構造を有するタンパ

ク質上に、環状タンパク質は、その構造を保持させた状態で提示されていると考えることができる。なお、本発明においては、環状ペプチドが構造を保持していることを、改変タンパク質の構造情報を取得することにより確認してもよい。

[0014] ループ構造を有するタンパク質としては、特に限定されるものではないが、以下のタンパク質として例示できる。以下、これらを「足場タンパク質」という場合がある。

足場タンパク質としては、特に限定されるものではないが、例えば、イムノグロブリン、フィブロネクチン、アルブミン、ヒト成長ホルモン、アルカリフォスファターゼ、レチノール結合タンパク質、ユテログロビン、フィブリノーゲン、血液凝固因子、トランスフェリン、Ｃａｓ９を含むゲノム編集酵素、Ｇタンパク質共役型受容体、サイトカイン受容体、成長因子受容体、インテグリン、カドヘリン、トランスフェリン受容体、免疫受容体、ウイルスエンベロープタンパク質及びウイルスキャプシドタンパク質等が挙げられる。

足場タンパク質としては、部分断片タンパク質であってよく、上記例示しているタンパク質の部分断片タンパク質が例示される。

足場タンパク質は、ループ構造を有するのであれば、全長タンパク質における一部分の構造として、ループ構造を含む部分断片を用いてもよい。

また、足場タンパク質としては、ループ構造を有するタンパク質又はそのループ構造を有する部分断片タンパク質に、さらに別のタンパク質が融合していてもよい。

[0015] 上記例示した足場タンパク質は、その二次構造において、ループ構造を有する。

ループ構造としては、特に限定されるものではないが、αヘリックス及び／又はβシートを連結するポリペプチド鎖領域であって、折れ曲がり構造を有する構造を意味する。

本発明においては、上記例示した各足場タンパク質に存在するループ構造

を用いることができる。

[0016] 本発明においては、足場タンパク質のループ構造内に、環状ペプチドを挿入して、環状ペプチドと足場タンパク質とを融合させるが、当該融合は、共有結合による融合であることが好ましい。

環状ペプチドと共有結合させるループ構造としては、特に限定されるものではなく、上記例示した足場タンパク質に存在するループ構造であってよい。

ループ構造中、どの部位に環状ペプチドを挿入するかは、特に限定されるものではなく、汎用性をもってループ構造中の任意の部位に環状ペプチドを挿入してよい。

ループ構造における任意の部位とは、環状ペプチドを挿入するための２つのアミノ酸残基が、ループ構造内から選択される部位であることを意味する。

ループ構造内の２つのアミノ酸残基は、ループ構造において、２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が４～７Åで存在し、しかもどちらも少なくとも部分的にはタンパク質表面に露出している２つのアミノ酸残基であることが好ましい。

２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が４～７Åにあることにより、足場タンパク質に融合された環状ペプチドは、元の環状ペプチドにおける構造を改変ペプチドにおいても維持しやすいこととなる。

２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離は、立体構造が明らかな足場タンパク質の構造データから確認することができる。足場タンパク質の立体構造が明らかで無い場合でも、その相似タンパク質（ホモログ）の構造情報から構築したモデル構造があれば、上記２アミノ酸残基間の距離は見積もることができる。

[0017] ループ構造内において環状ペプチドと融合するために選択される２つのアミノ酸残基は、ループ構造内に存在する隣接するアミノ酸残基であってもよいが、２つのアミノ酸残基が隣接しないアミノ酸残基同士であることが好ま

しい。２つのアミノ酸残基が隣接しないとは、２つのアミノ酸残基が、タンパク質のループ構造におけるアミノ酸一次配列において、不連続なアミノ酸残基であることと同義である。

例えば、タンパク質の結晶構造において、２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が４～７Åであるような配置の２つのアミノ酸残基を選択する場合、足場タンパク質において、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基の間に１～１５アミノ酸残基存在していてもよい。２つのアミノ酸残基の間に１～１５アミノ酸残基存在しているとは、２つのアミノ酸残基が、タンパク質のループ構造におけるアミノ酸一次配列において、１～１５アミノ酸残基を介して存在していることと同義である。

２つのアミノ酸残基の間の１～１５アミノ酸残基部分は、ループ構造を形成するアミノ酸残基であることが好ましい。

[0018] 本発明の環状ペプチドをループ構造を有するタンパク質上に提示する方法においては、環状ペプチドは、ループ構造を有するタンパク質を足場として、該足場タンパク質上に提示されるが、好適には、ループ構造が環状ペプチドに置き換わることにより、タンパク質の構造及び環状ペプチドの構造が保持される。

ループ構造から、２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が４～７Åとなるように環状ペプチドと結合させる２つのアミノ酸残基を選択することにより、タンパク質の本来有する構造を維持することができると共に、環状ペプチドの活性を保持することができる。

[0019] 本発明において、環状ペプチドが、その活性を保持しているとは、ループ構造を有するタンパク質に融合させる環状ペプチドは、何らかの生理活性を有する化合物として知られていることが好ましく、環状ペプチドとして有する生理活性が、環状ペプチドをタンパク質に融合させた後も、当該生理活性を保持していることを意味する。

なお、その場合に、生理活性の程度は、タンパク質に融合させた前後で、異なる活性値／阻害値を示してもよい。

[0020] 本発明において、「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」とは以下の意味で用いる。

ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えるとは、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基において、環状ペプチドの化学架橋構造以外の構造が結合していてもよく、環状ペプチドの化学架橋構造を除いて、さらに環状ペプチドの環状構造を構成する１又は複数のアミノ酸を除いた部分アミノ酸配列が結合していてもよい。

すなわち、部分アミノ酸配列が結合しているとは、環状ペプチドにおける活性、より具体的には、生理活性を示すための構造を含む部分構造が結合していればよい。

また、環状ペプチドを構成するアミノ酸は、以下に示すとおり、タンパク質性アミノ酸及び／又は非タンパク質性アミノ酸であり得、一部に非タンパク質性アミノ酸を含む環状ペプチドであることが好適であるが、環状ペプチドが非タンパク質性アミノ酸を含む場合、環状ペプチドが融合された改変タンパク質においては、環状ペプチドに由来する非タンパク質性アミノ酸は、タンパク質性アミノ酸に置換されていることが好ましい。

[0021] 環状ペプチドを構成するタンパク質性アミノ酸は、足場タンパク質と融合させる際に、そのままのアミノ酸として融合させることが好ましいが、他のタンパク質性アミノ酸に置換して融合してもよい。

また、融合させる環状ペプチドのアミノ酸配列は、元の環状ペプチドのアミノ酸配列と同一であってもよく、１又は複数のアミノ酸を置換、欠失又は挿入した配列であってもよい。

[0022] 本発明において、１又は複数のアミノ酸という場合、１、２、３、４、５、６、７、８、９あるいは１０個のアミノ酸であってもよく、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２あるいは１個のアミノ酸であってよい。

[0023] 本発明において、「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、環状ペプチドの化学架橋構造が

、リンカー配列を介してループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられていてよい。

リンカー配列を介して置き換えられる場合、環状ペプチドが融合された改変タンパク質においては、Ｎ末端側においては、ループ構造に由来するアミノ酸配列、リンカー配列、環状ペプチドに由来するアミノ酸配列という順序で融合し、Ｃ末端側においては、環状ペプチドに由来するアミノ酸配列、リンカー配列、ループ構造に由来するアミノ酸配列という順序で融合している。

Ｎ末端側、Ｃ末端側双方でリンカー配列を有していてもよく、Ｎ末端側及びＣ末端側の一方でリンカー配列を有していてもよい。

[0024] リンカー配列としては、特に限定されるものではないが、１又は複数のＳｅｒ、ＧｌｙおよびＣｙｓからなる配列が挙げられ、１～５、１～４、１～３、１～２あるいは１個のＳｅｒ、ＧｌｙおよびＣｙｓからなる配列が挙げられる。リンカー配列としては、Ｓｅｒおよび／又はＧｌｙからなる配列が好ましく用いられる。

[0025] 本発明において、「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んで、環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられていてもよい。

ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んで置き換えられる場合、環状ペプチドが融合された改変タンパク質においては、Ｎ末端側においては、ループ構造を構成する２つのアミノ酸のＮ末端側の一方のアミノ酸、ループ構造に由来するアミノ酸配列、所望によりリンカー配列、環状ペプチドに由来するアミノ酸配列という順序で融合し、Ｃ末端側においては、環状ペプチドに由来するアミノ酸配列、所望によりリンカー配列、ループ構造に由来するアミノ酸配列、ループ構造を構成する２つのアミノ酸のＣ末端側の他方のアミノ酸、という順序で融合してい

る。

Ｎ末端側、Ｃ末端側双方でループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んでいてもよく、Ｎ末端側及びＣ末端側の一方でループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列とは、ループ構造を構成する２つのアミノ酸に挟まれたループ構造に由来するアミノ酸配列であって、それぞれ、ループ構造を構成する２つのアミノ酸に隣接して結合するアミノ酸配列であることが好ましい。

[0026] より具体的に説明する。

本発明において、環状ペプチドの化学架橋構造を置き換える足場タンパク質に存在する２つのアミノ酸残基のうち、ループ構造を構成するアミノ酸残基であって、Ｎ末端側に位置するアミノ酸残基をB_N、Ｃ末端側のアミノ酸残基をB_Cとする場合、環状ペプチドのループ構造は、－B_N－（Ｘａａ１）$_m$－B_C－で表される構造を含む（ループ構造を形成している限り、Ｘａａ１は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸残基であり、ｍは、０以上の任意の整数であり、１～１５の整数であることが好適である。）。

「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、環状ペプチドに由来するアミノ酸は、B_Nと結合していてもよく、B_Nとリンカー配列を介して結合していてもよく、B_Nから任意の数で表される番目のＸａａ１と、所望によりリンカー配列を介して結合していてもよい。

また、「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、環状ペプチドに由来するアミノ酸は、B_Cと結合していてもよく、B_Cとリンカー配列を介して結合していてもよく、B_Cから任意の数で表される番目のＸａａ１と、所望によりリンカー配列を介して結合していてもよい。

B_Nから任意の数で表される番目のＸａａ１と、所望によりリンカー配列を

介して結合している場合、あるいは、B_Cから任意の数で表される番目のＸａａ１と、所望によりリンカー配列を介して結合していている場合、環状ペプチドを融合した改変タンパク質は、ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含むこととなる。

[0027] 一方、環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を形成する２つのアミノ酸残基のうち、Ｎ末端側に位置するアミノ酸残基をC_N、Ｃ末端側のアミノ酸残基をC_Cとする場合、環状ペプチドは、C_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_Cで表される一次配列を少なくとも有する（環状ペプチドを形成し得る限り、Ｘａａ２は、それぞれ独立して、任意のアミノ酸残基であり、ｎは、２以上の任意の整数である。）。環状ペプチドは、分子内環状構造以外にも環状構造からの鎖状の分岐鎖を有していてもよい。なお、環状ペプチドにおいては、２つのアミノ酸残基であるC_NとC_Cが、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を形成して環状ペプチドとなる。

「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、ループ構造を構成する２つのアミノ酸、あるいは、ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸は、所望によりリンカー配列を介して、C_N及び／又はC_Cと結合していてもよい。

C_N及び／又はC_Cが、非タンパク質性アミノ酸である場合には、タンパク質性アミノ酸に置換されていることが好ましく、C_N及び／又はC_CがＣｙｓである場合には、C_N及び／又はC_Cを欠失させてもよく、C_CがＣｙｓである場合には、C_Nは、Ｃｙｓに置換して、環状ペプチドが融合されていてもよい。

「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、環状ペプチドに由来するアミノ酸は、C_Nで結合していてもよく、C_Nでリンカー配列を介して結合していてもよく、C_Nから任意の数で表される番目のＸａａ２で、所望によりリンカー配列を介して結合していてもよい。中でも、C_Nが非タンパク質性アミノ酸である場合には、C_Nをタンパク質性アミノ酸に置換して、所望によりリンカー配列を介して結合し

ていてもよい。

また、「環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える」際に、環状ペプチドに由来するアミノ酸は、C_Cで結合していてもよく、C_Cでリンカー配列を介して結合していてもよく、C_Cから任意の数で表される番目のＸａａ２で、所望によりリンカー配列を介して結合していてもよい。中でも、C_Cを欠失させて、C_Cから数えて１番目のＸａａ２で、すなわち、C_Cと結合するＸａａ２で、所望によりリンカー配列を介して結合していてもよい。

C_Nから任意の数で表される番目のＸａａ２と、所望によりリンカー配列を介して結合している場合、あるいは、C_Cから任意の数で表される番目のＸａａ２と、所望によりリンカー配列を介して結合していている場合、環状ペプチドを融合した改変タンパク質は、環状ペプチドの部分配列を含むこととなる。

[0028] 環状ペプチドが、ループ構造を有するタンパク質に融合されるとは、ループ構造－B_N－（Ｘａａ１）$_m$－B_C－の－（Ｘａａ１）$_m$－における全部又は一部の－（Ｘａａ１）$_p$－に代えて、環状ペプチドにおいて、分子内環状構造を構成するC_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_Cの全部又は一部が置き換わることを意味する。

構造としては、－B_N－（Ｘａａ１）$_q$－［C_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_C］－（Ｘａａ１）$_r$－B_C－で表される構造となる。なお、該構造においては、リンカー配列を含まない場合として記載しているが（ｐはｍ以下の整数であり、ｐ＋ｑ＋ｒは、ｍとなる。ｑとｒは、０以上の整数であるが、０～１０の整数であることが好適である。）、リンカー配列を含む場合には、（Ｘａａ１）$_q$－［C_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_C］の結合、［C_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_C］－（Ｘａａ１）$_r$の結合間に、リンカー配列が存在することとなる。

なお、［C_N－（Ｘａａ２）$_n$－C_C］は、当該配列における全部又は一部のアミノ酸配列が融合していることを意味する。好適には、部分配列として、C_N－（Ｘａａ２）$_n$が融合される。また、C_N及び／又はC_Cが、非タンパク質性ア

ミノ酸である場合には、それぞれ、タンパク質性アミノ酸として融合していることを意味してよい。

ここで、B_NとB_Cで表されるアミノ酸残基は、ループ構造におけるアミノ酸残基をそのまま用いてもよいが、別のアミノ酸残基に置換してもよい。また、C_NとC_Cで表されるアミノ酸残基は、環状ペプチドにおけるアミノ酸残基をそのまま用いてもよいが、別のアミノ酸残基に置換してもよいし、欠失させてもよい。好適には、C_Nは、タンパク質性アミノ酸に置換され、C_Cは、欠失させる。

[0029] 環状ペプチドを融合させた改変タンパク質においては、環状ペプチド由来のアミノ酸配列におけるＮ末端アミノ酸とそのＮ末端側で融合しているB_Nとしたループ構造を構成する２つのアミノ酸残基までの間のアミノ酸数と、環状ペプチド由来のアミノ酸配列におけるＣ末端アミノ酸とそのＣ末端側で融合しているB_Cとしたループ構造を構成する２つのアミノ酸残基までの間のアミノ酸数とは、同一でも異なっていてもよい。

環状ペプチド由来のアミノ酸配列におけるＮ末端アミノ酸とそのＮ末端側で融合しているB_Nとしたループ構造を構成する２つのアミノ酸残基までの間のアミノ酸数は、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９あるいは１０個であってもよく、０～１０、０～９、０～８、０～７、０～６、０～５、０～４、０～３、０～２、０～１あるいは０個のアミノ酸であってよい。

環状ペプチド由来のアミノ酸配列におけるＣ末端アミノ酸とそのＣ末端側で融合しているB_Cとしたループ構造を構成する２つのアミノ酸残基までの間のアミノ酸数についても同様に、０、１、２、３、４、５、６、７、８、９あるいは１０個であってもよく、０～１０、０～９、０～８、０～７、０～６、０～５、０～４、０～３、０～２、０～１あるいは０個のアミノ酸であってよい。

[0030] 環状ペプチドは、一般的なｍＲＮＡディスプレイ法により製造されるペプチドであってよく、ＴＲＡＰ法やＲａＰＩＤ法で製造されるペプチドであってもよく、また、ファージディスプレイ法により製造されるペプチドであっ

てもよい。また、これらの変法におり製造されるペプチドであってもよい。

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造として、例えば、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を含む。

通常、ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法により選択される環状ペプチドは、チオエーテル結合又はジスルフィド結合といった分子内環状構造を形成するための化学架橋構造以外の構造が、生理活性を有する活性点であることが多い。

そうすると、環状ペプチドのチオエーテル結合又はジスルフィド結合を、ループ構造を有するタンパク質との結合に置き換えることにより、通常、ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法により得られる環状ペプチドの高い特異性と親和性を、所望のタンパク質の所望のループ構造内に賦与することができる。また。特に限定されるものではないが、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を分子内環状構造として有する環状ペプチドを融合することにより、環状ペプチドを汎用性をもって融合させることができる。

[0031] 環状ペプチドとしては、特に限定されるものではないが、天然型の環状ペプチドを用いてもよく、非天然型の環状ペプチドを用いてもよい。

天然型の環状ペプチドをタンパク質上に提示する場合には、アミノ酸残基同士を結合するいずれの結合も、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造といえるため、いずれの結合を採用することもできるが、天然型の環状ペプチドにおける活性部位と考えられる領域以外のアミノ酸残基同士の結合を、タンパク質と融合させるための化学架橋構造とすることが好ましい。

[0032] 環状ペプチドは、４以上のアミノ酸残基により形成される環状構造を分子内に少なくとも有するペプチドである。４以上のアミノ酸残基により形成される環状ペプチドにおける環状構造は、直鎖状ペプチドにおいて、２アミノ酸以上離れた２つのアミノ酸残基が直接に、又はリンカー等を介して結合することによって分子内に形成される閉環構造である。

２つのアミノ酸残基が２アミノ酸以上離れていることは、２つのアミノ酸

残基の間に少なくとも２つのアミノ酸残基が存在していることと同義であり、２つのアミノ酸残基は、その間に２つ以上のアミノ酸を介して結合することとなる。

[0033] 環状構造における閉環構造は、特に限定されないが、２つのアミノ酸が、共有結合することにより形成される。

２つのアミノ酸間の共有結合としては、例えば、ジスルフィド結合、ペプチド結合、アルキル結合、アルケニル結合、エステル結合、チオエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ホスホネートエーテル結合、アゾ結合、Ｃ－Ｓ－Ｃ結合、Ｃ－Ｎ－Ｃ結合、Ｃ＝Ｎ－Ｃ結合、アミド結合、ラクタム架橋、カルバモイル結合、尿素結合、チオ尿素結合、アミン結合、及びチオアミド結合等が挙げられる。

２つのアミノ酸がアミノ酸の主鎖において結合すると、ペプチド結合により閉環構造が形成されるが、２つのアミノ酸の側鎖同士、側鎖と主鎖の結合等により、２つのアミノ酸間の共有結合は形成されてもよい。

[0034] 環状構造は、直鎖状ペプチドのＮ末端とＣ末端のアミノ酸の結合に限られず、末端のアミノ酸と末端以外のアミノ酸の結合、又は末端以外のアミノ酸同士の結合により形成されてもよい。環状構造を形成するために結合する２つのアミノ酸の一方が末端アミノ酸で、他方が非末端アミノ酸である場合、環状ペプチドは、環状構造からの鎖状の分岐鎖として、環状構造に直鎖のペプチドが尾のように付いた構造を有する。

[0035] 環状構造を形成するアミノ酸としては、タンパク質性アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含み、例えば、タンパク質性Ｌ－アミノ酸、アミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。

タンパク質性アミノ酸（ｐｒｏｔｅｉｎｏｇｅｎｉｃ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ）は、当業界に周知の３文字表記により表すと、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｌａ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、及

びＶａｌである。

非タンパク質性アミノ酸（ｎｏｎ－ｐｒｏｔｅｉｎｏｇｅｎｉｃ　ａｍｉｎｏ　ａｃｉｄｓ）としては、タンパク質性アミノ酸以外の天然又は非天然のアミノ酸を意味する。

非天然アミノ酸としては、例えば、主鎖の構造が天然型と異なる、α，α－二置換アミノ酸（α－メチルアラニンなど）、Ｎ－アルキル－α－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸、β－アミノ酸、α－ヒドロキシ酸や、側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸（ノルロイシン、ホモヒスチジンなど）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、ホモヒスチジンなど）、及び側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸など）等が挙げられる。非天然アミノ酸の具体例としては、国際公開第２０１５／０３００１４号に記載のアミノ酸が挙げられる。

[0036] 環状構造を形成するアミノ酸の数は４以上であれば特に限定されないが、例えば、５以上、８以上、１０以上であってもよく、３０以下、２５以下、２０以下、１５以下であってもよい。

環状構造を形成するアミノ酸の数としては、４以上３０以下であることが好ましく、４以上３０以下の範囲内で、環状構造を形成するアミノ酸の数を５以上、８以上、１０以上としてもよく、３０以下、２５以下、２０以下、１５以下としてもよい。

環状構造を形成するアミノ酸の数は、８以上２０以下としてもよく、１０以上２０以下としてもよく、１０以上１５以下としてもよい。

[0037] 本発明において用いられる環状ペプチドは、公知のペプチド合成技術を用いて製造することのできる環状ペプチドである。

環状ペプチドの製造方法としては、例えば、液相法、固相法、液相法と固相法を組み合わせたハイブリッド法等の化学合成法、遺伝子組み換え法、無細胞翻訳系による翻訳合成法等が挙げられる。

[0038] 環状ペプチドは、ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレ

イ法やファージディスプレイ法により好適に製造できるペプチドを用いることが好ましい。

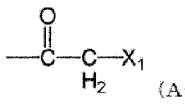
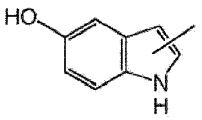
[0039] ＲａＰＩＤ法においては、例えば、下記表１に示す官能基１を有するアミノ酸と、対応する官能基２を有するアミノ酸が環状化した環状ペプチドとすることができる。

官能基１と２はどちらがＮ末端側にきてもよく、Ｎ末端とＣ末端に配置してもよいし、一方を末端アミノ酸、他方を非末端アミノ酸としてもよいし、両方を非末端アミノ酸としてもよい。

官能基１と官能基２により形成される結合が、環状ペプチドにおける分子環状構造を形成するための化学架橋構造といえる。

[0040] 表１：

[表1]

	官能基1	官能基2
(A)	 (A－1)	HS— (A－2)
(B)	—C≡C—H (B－1)	N_3— (B－2)
(C)	—Ar—CH_2NH_2 (C－1)	 (C－2)
(D)	—C≡C–CH_2–X_1 (D－1)	HS— (D－2)
(E)	—Ar—CH_2—X_1 (E－1)	HS— (E－2)

式中、X_1は脱離基であり、脱離基としては、例えば、ＣＩ、Ｂｒ及びＩ等のハロゲン原子が挙げられ、Ａｒは置換基を有していてもよい芳香環である。

[0041] ファージディスプレイ法においては、Ｃｙｓ同士が結合して環状化した環状ペプチドとすることができるため、官能基１としての－ＳＨと官能基２としてのＨＳ－によるジスルフィド結合を有する環状ペプチドとすることができる。

[0042] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル

化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophane、β-N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、σ-N-chloroacetyl-L-ornithine、ε-N-chloroacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するＤ－アミノ酸誘導体等が挙げられる。

（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-tryptophan及びN-chloroacetyl-L-tyrosineが好適に用いられ、Ｄ体であることがより好適である。

なお、本明細書において、Ｌ体であることを明示して記載する場合があるが、Ｌ体であってもよく、Ｄ体であってもよいことを意味し、また、Ｌ体とＤ体の任意の割合での混合物であってもよい。Ｌ体及びＤ体であることを明示して記載していない場合についても、Ｌ体であってもよく、Ｄ体であってもよいことを意味し、また、Ｌ体とＤ体の任意の割合での混合物であってもよい。

[0043] （Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、cysteineが好適に用いられる。

[0044] （Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nature Chemical Biology 5, 888-890 (2009)；Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)；Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)；Goto, Y. et al., ACS Chemical Biology 3, 120-129 (2008)；Kawakami T. et al, Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)、及

び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0045] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、及び2-amino-8-nonynoic acid等が挙げられる。

4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸を用いてもよい。

4-pentynoyl化アミノ酸としては、例えば、N-(4-pentenoyl)-L-alanine、N-(4-pentenoyl)-L-phenylalanine、N-(4-pentenoyl)-L-tyrosine、N-(4-pentenoyl)-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophane、β-N-(4-pentenoyl)-L-diaminopropanoic acid、γ-N-(4-pentenoyl)-L-diaminobutyric acid、σ-N-(4-pentenoyl)-L-ornithine、ε-N-(4-pentenoyl)-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

5-hexynoyl化アミノ酸としては、4-pentynoyl化アミノ酸として例示した化合物において、4-pentynoyl基が、5-hexynoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0046] （Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、及び2-amino-8-azidooctanoic acid等が挙げられる。

azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸を用いることもできる。

azidoacetyl化アミノ酸としては、例えば、N-azidoacetyl-L-alanine、N-azidoacetyl-L-phenylalanine、N-azidoacetyl-L-tyrosine、N-azidoacetyl-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophane、β-N-azidoacetyl-L-diaminopropanoic acid、γ-N-azidoacetyl-L-diaminobutyric acid、σ-N-azidoacetyl-L-ornithine、ε-N-azidoacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

3-azidopentanoyl化アミノ酸としては、azidoacetyl化アミノ酸として例示した化合物において、azidoacetyl基が、3-azidopentanoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0047] （Ｂ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｂ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., Journal of American Chemical Society 130, 7932-7934 (2008)、及び国際公開第２００８／１１７８３３号等に記載された方法が挙げられる。

[0048] （Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)及び3-aminomethyltyrosine等が挙げられる。

（Ｃ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、5-hydroxytryptophan(WOH)等が挙げられる。

（Ｃ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｃ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009)及び国際公開第２００８／１１７８３３号に記載された方法等が挙げられる。

[0049] （Ｄ－１）の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic acid、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、及び2-amino-8-chloro-octynoic acid等が挙げられる。

（Ｄ－２）の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ｄ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｄ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、国際公開第２０１２／０７４１２９号に記載された方法等が挙げられる。

[0050] （Ｅ－１）のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophane、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる

。

（Ｅ－２）のアミノ酸としては、例えば、cysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、 mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8- mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

（Ｅ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ｅ－２）の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、（Ａ－１）と（Ａ－２）の環状化方法や（Ｄ－１）と（Ｄ－２）の環状化方法を参考にして行うことができる。

[0051] 環形成アミノ酸としては、（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸と（Ａ－２）の官能基を有するアミノ酸との組み合わせが好ましく、脱離基でＨが置換されたＮ－アセチルトリプトファンとcysteinの組み合わせがより好ましく、N-haloacetyl-D-tyrosine又はN-haloroacetyl-D-tryptophan、好適にはN-chloroacetyl-D-tyrosine又はN-chloroacetyl-D-tryptophanとcystein(Cys)の組み合わせがさらに好ましい。

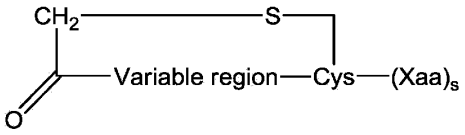
[0052] 本発明においては、ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法により製造される環状ペプチドであって、所望の結合分子に対して生理活性を有する環状ペプチドを用いることが好ましい。

ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法により好適に製造できるペプチドにおける官能基１及び官能基２により形成される結合を分子内環状構造を形成するための化学架橋構造として、ループ構造を有するタンパク質と融合させることが好ましい。

[0053] 本発明において用いられる環状ペプチドについて、ＲａＰＩＤ法により製造される環状ペプチドを例に、以下説明する。

本発明において、ＲａＰＩＤ法により製造される環状ペプチドとしては、特に限定されるものではないが、以下の一般式で表される環状ペプチドが挙げられる。

[化1]



上記一般式で表される環状ペプチドは、例示となるが、表１に記載の官能基１及び官能基２として、（Ａ）である場合の構造を有する。

ここで、一般式において、ＳはＣｙｓのチオール基に由来する硫黄原子を意味する。Ｘａａは任意のアミノ酸を示し、ｓは任意の０以上の整数である。Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）は、環状アミノ酸を構成するＣｙｓ以外のアミノ酸配列を示す。Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）のＮ末端のアミノ酸は、上記（Ａ－１）の官能基を有するアミノ酸であることが好ましい。

Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）のアミノ酸配列は、ＲａＰＩＤ法により製造される環状ペプチドにおける部分アミノ酸配列であり、環状ペプチドを構成する限り、任意のアミノ酸配列であり得る。

[0054] 環状ペプチドとして、上記一般式で表されるペプチドが用いられる場合には、Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎのＮ末端のアミノ酸残基が、C_Nであり、Ｃｙｓが、C_Cである。

C_Nが、例えば、非タンパク質性アミノ酸であるN-haloroacetyl-D-tryptophanである場合には、タンパク質性アミノ酸であるL-tryptophanに置換して、例えば、非タンパク質性アミノ酸であるN-chloroacetyl-D-tyrosineである場合には、タンパク質性アミノ酸であるL-tyrosineに置換して環状ペプチドが融合されることが好適である。また、C_Nをタンパク質性アミノ酸であるＣｙｓに置換してもよい。C_Cが、例えば、Ｃｙｓである場合には、C_Cを欠失させて環状ペプチドが融合されることが好適であるし、また、C_CがＣｙｓである場合に、C_CであるＣｙｓをも融合させる場合には、C_NをＣｙｓに置換して融合することも好ましい。一般式で表される環状ペプチドが融合される場合、所望により、Ｄ－アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸に置換されるものの、環状ペプ

チドの環状構造を構成するアミノ酸配列の部分アミノ酸配列として、Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）のアミノ酸配列が、環状ペプチドが融合された改変タンパク質に融合されることが好ましい。本発明においては、Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）のアミノ酸配列の一部が、例えば、C_Nが非タンパク質性アミノ酸である場合に、タンパク質性アミノ酸に置換されている場合も、Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）のアミノ酸配列が、環状ペプチドが融合された改変タンパク質に融合されていると理解される。Ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ（可変領域）とC_CであるＣｙｓが共に、融合されていてもよい。

[0055] ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法により好適に製造できる環状ペプチドをループ構造を有するタンパク質と融合させる場合には、具体的には、以下のような改変を行うことも好適である。

（１）ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法やファージディスプレイ法における分子内環状構造を形成するための化学架橋構造に関与するアミノ酸残基をそれぞれ置換又は削除して、環状ペプチド由来のアミノ酸残基と、ループ構造由来のアミノ酸残基とを融合させてもよい。

具体的には、ＲａＰＩＤ法による環状ペプチドにおいては、官能基１を有するアミノ酸残基をタンパク質性アミノ酸に置換し、官能基２を有するアミノ酸残基をそれぞれ欠失して、ループ構造と融合する。官能基１を有するアミノ酸残基として、Ｄ－アミノ酸等の非タンパク質性アミノ酸が用いられることがある。

ファージディスプレイ法による環状ペプチドにおいては、化学架橋構造であるＳ－Ｓ結合を構成するＣｙｓ残基を削除して、ループ構造と融合してもよい。

より具体的には、ＲａＰＩＤ法において、官能基１として（Ａ－１）の構造が採用されている場合、一般に、（Ａ－１）の構造を有するアミノ酸としては、ＣＩＡｃ－Ｄ－ＴｒｐやＣＩＡｃ－Ｄ－Ｔｙｒが用いられていること

が多いが、改変タンパク質においては、該アミノ酸残基をＬ－ＴｒｐやＬ－Ｔｙｒに置換することが好ましい。また、ＣｌＡｃ－Ｄ－ＴｒｐやＣｌＡｃ－Ｄ－Ｔｙｒを欠失させてもよい。

また、（Ａ－２）の構造を有するアミノ酸としては、Ｃｙｓが用いられていることが多いが、改変タンパク質においては、該Ｃｙｓ残基を欠失させてもよい。

（２）（１）において、環状ペプチドは有さないが、Ｓｅｒ、Ｇｌｙ及びＣｙｓといったアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を環状ペプチドとループ構造とのリンカー配列として用いて、環状ペプチド由来のアミノ酸残基と、ループ構造由来のアミノ酸残基との間に挿入して、融合させてもよい。

（３）分子内環状構造を形成するための化学架橋構造に関与するアミノ酸残基をＬ－Ｃｙｓに変換し、環状ペプチドをループ構造と融合させた改変タンパク質において、ジスルフィド結合により架橋構造を形成させると共に、Ｓｅｒ及びＧｌｙといったアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を環状ペプチドとループ構造とのリンカー配列として用いて、環状ペプチド由来のアミノ酸残基と、ループ構造由来のアミノ酸残基との間に挿入して、融合させてもよい。

リンカー配列を構成するアミノ酸残基の数は、１以上のアミノ酸残基であればよく、アミノ酸残基の数は、特に限定されるものではない。

[0056] 本発明においては、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に提示する方法において環状ペプチドをループ構造を有するタンパク質に融合させることを含むが、環状ペプチドをループ構造を有するタンパク質に融合させるには、通常の遺伝子工学技術を用いて行うことができる。

具体的には、本発明は、環状ペプチドをタンパク質に融合させる方法として、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させて環状ペプチドをタンパク質上に提示させた改変タンパク質の製造方法をも提供する。

本発明における、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させて環状ペプチドをタンパク質上で提示させた改変タンパク質の製造方法

は、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドのアミノ酸配列から、タンパク質上で提示させる部分アミノ酸配列を選択し、該部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を選択し、

ループ構造を有するタンパク質のループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に相当する塩基配列を選択し、該選択された塩基配列間に存在する塩基を必要に応じて削除し、選択された環状ペプチドの部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を挿入して組み込んだ塩基配列を有する核酸を準備し、

該核酸を翻訳する、改変タンパク質の製造方法である。

[0057] 環状ペプチドとしては、ＲａＰＩＤ法やＴＲＡＰ法のようなｍＲＮＡディスプレイ法又はファージディスプレイ法により選択される環状ペプチドを用いることが好ましく、ｍＲＮＡディスプレイ法によることがより好ましく、ｍＲＮＡディスプレイ法等によれば、環状ペプチドのうち、挿入すべき部分アミノ酸配列の塩基配列は容易に理解することができる。

[0058] ループ構造を有するタンパク質のループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に相当する塩基配列を選択し、該選択された塩基配列間に存在する塩基を必要に応じて削除する方法や、選択された環状ペプチドの部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を挿入して組み込んだ塩基配列を有する核酸を準備する方法は、特に限定されるものではなく、従来公知の方法を援用して実施することができる。

また、準備された核酸の翻訳方法は、本発明の属する技術分野において、既に周知な事項であるので、それら周知な方法を適宜適用して、核酸の翻訳を行えばよい。

[0059] ループ構造を有するタンパク質のループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に相当する塩基配列を選択するにあたっては、ループ構造を有するタンパク質のアミノ配列において（部分断片タンパク質のアミノ酸配列であってもよく、融合タンパク質のアミノ酸配列であってもよい。）、ループ構造を構成するアミノ酸配列の中から、環状ペプチドを融合させる足場となる２つの

アミノ酸残基が選択される。

２つのアミノ酸残基は、足場タンパク質の構造データを用いたり、足場タンパク質の立体構造が明らかで無い場合でも、その相似タンパク質（ホモログ）の構造情報から構築したモデル構造を用いることにより、選択することができる。

２つのアミノ酸残基を選択するにあたっては、複数のループ構造を有する足場タンパク質を選択している場合には、環状ペプチドを融合させるループ構造を選択し、当該ループ構造内からＣα原子間距離が４～７Åにある２つのアミノ酸残基を選択することが好ましい。

２つのアミノ酸残基を選択する際には、１～１５アミノ酸残基離れた２つのアミノ酸残基を選択することが好ましく、Ｃα原子間距離が４～７Åにあり、かつ、１～１５アミノ酸残基離れた２つのアミノ酸残基を選択することがより好ましい。

ここで、足場タンパク質から選択した２つのアミノ酸残基のうち、元の足場タンパク質において、Ｎ末端側にあるアミノ酸残基をB_Nとし、Ｃ末端側にあるアミノ酸残基をB_Cとする。

B_Nに結合するＣ末端側のアミノ酸配列を環状ペプチドとの結合に用いてもよく、また、B_Cに結合するＮ末端側のアミノ酸配列を環状ペプチドとの結合に用いてもよい。

[0060] 環状ペプチドと結合させるアミノ酸残基を選択した後、リンカー配列の付加を選択することもできる。

[0061] 足場タンパク質に融合させる環状ペプチドの選択においては、何らかの生理活性を有することが知られている、あるいは、生理活性を有することを確認した環状ペプチドを選択することが好ましい。また、環状ペプチドのアミノ酸配列は、常法により、適宜確認してもよい。

環状ペプチドの化学架橋構造となる結合を特定し、当該結合を切断することにより得られる一次アミノ酸配列情報に基づいて、融合させる環状ペプチドにおけるアミノ酸配列を選択する。

[0062] 選択されたアミノ酸配列に基づいて、タンパク質に必要な翻訳に必要となる塩基配列を決定して、翻訳することにより所定の改変タンパク質を製造することができる。

[0063] 本発明の方法により得られるループ構造を有するタンパク質を足場として、環状ペプチドをタンパク質上に提示させた改変タンパク質は、環状ペプチドの構造と活性を保持させた状態で環状ペプチドを提示するので、環状ペプチドの活性に基づいた試薬、医薬等として用いることができる。

また、環状ペプチドが融合された改変タンパク質は、タンパク質自体が有している活性に加え、環状ペプチドの有する活性を示すため、２種の異なる又は同種の活性を有する改変タンパク質として用いることも可能である。

[0064] 本発明においては、１の環状ペプチドが、１又は２以上のループ構造を有するタンパク質の１又は２以上のループ構造にそれぞれ融合していてもよく、２以上の環状ペプチドが、複数のループ構造を有するタンパク質の異なるループ構造にそれぞれ融合していてもよい。

２以上の環状ペプチドが融合する場合、同一のアミノ酸配列を有する環状ペプチドであってもよく、２以上の環状ペプチドが異なるアミノ酸配列を有する環状ペプチドであってもよい。

実施例

[0065] 以下、実施例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0066] 結合分子としたヒトプレキシンＢ１、ヒトＭｅｔ受容体、ヒトＥＧＦ受容体及びヒトＴｒｋＢ受容体に対して、国際公開第２０１１／０４９１５７号及び特開２０１３－４６６３７号公報等に基づいてＲａＰＩＤシステムを実施して、それぞれに特異的に結合する環状ペプチドを１～３種類ずつ得た。環状ペプチドの構造を図１に示す。

[0067] 図１において、可変領域のアミノ酸配列のＮ末端アミノ酸及び定常部のＣｙｓ（一般式中に図示）がそれぞれ後に連結に用いるアミノ酸残基C_N及びC_Cに対応する。なお、環状ペプチドのＮ末端アミノ酸としてｗ及びｙと小文字

で示されるＤ－アミノ酸は、それぞれＬ－アミノ酸に置換して、あるいは、欠失させて融合タンパク質に導入した。

[0068] 図１に記載の環状ペプチドのうち、Ｐ６及びＰ７は、Ｃｅｌｌ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ，２０１６，２３，１３４１－１３５０に記載される環状ペプチドであり、いずれもヒトプレキシンＢ１に対して結合する活性を有している。ｍＰ６－９はＰ６のアミノ酸配列の一部を改変したもので、Ｐ６に同じくヒトプレキシンＢ１への結合性を有している。また、Ｐ６及びｍＰ６－９はヒトプレキシンＢ１に結合することによってヒトプレキシンＢ１へのセマフォリン４Ｄの結合をアロステリックに阻害し、結果として細胞においてセマフォリン４Ｄ刺激による形態変化を抑制する活性を有する（Ｃｅｌｌ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ，２０１６，２３，１３４１－１３５０）。

[0069] ａＭＤ４、ａＭＤ５及びａＭＬ５は、Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎ，２０１５，６，６３７３に記載される環状ペプチドであり、いずれもヒトＭｅｔ受容体に対して結合する活性を有している。また、これらのペプチドは単独ではヒトＭｅｔ受容体を活性化しないが、架橋により二量体化するとヒトＭｅｔ受容体の活性化を引き起こし、アゴニスト活性を有することがわかっている。

[0070] Ａ６－２ｆ及びｔｒｋＤ５はそれぞれ対応するヒトＥＧＦ受容体及びヒトＴｒｋＢ受容体にナノモルレベルの親和性で結合する。

[0071] 〔実施例１〕フィブロネクチンの第１０番目のＴｙｐｅ ＩＩＩリピートドメインと環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

上記８種類の生理活性環状ペプチドの化学架橋構造に置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有するタンパク質としてヒトフィブロネクチンの第１０番目のＴｙｐｅ ＩＩＩリピートドメイン（以下、「Ｆｎ１０」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上で６番目と７番目のβストランドで挟まれたループ部分からＣα原子間距離が４．１ÅであるＶａｌ１４９０（B_N

に相当）とＳｅｒ１４９９（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基として選定した。この部分の立体構造を図２に示す。

[0072] Ｆｎ１０において選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる８アミノ酸残基の一部を、図１で示した環状ペプチドの可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした（なお、環状ペプチドの可変領域のｗ又はｙで表される非タンパク質性アミノ酸は、タンパク質性アミノ酸であるW又はＹに置換して、融合された環状ペプチドの可変領域のアミノ酸配列がデザインされている。以下、同様である。また、Ｐ７を融合させる場合にのみ、Ｐ７の可変領域におけるＮ末のアミノ酸残基であるｗをＣｙｓに置換して、C_Cに相当するＣｙｓと共にデザインした。）。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドを融合後のループ部分のアミノ酸配列を図３に示す。

[0073] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒトプロラクチンのシグナル配列をコードするＤＮＡ、ヒトフィブロネクチンのアミノ酸残基番号１４１８～１５０９の領域をコードするＤＮＡ、そしてヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡをつないで、Ｆｎ１０－Ｆｃ融合タンパク質のコンストラクトを作成し、これを発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に組み込んだ。

[0074] Ｆｎ１０－Ｆｃ発現ベクターを元に、フィブロネクチン領域内のＶａｌ１４９０とＳｅｒ１４９９で挟まれるループ領域の８アミノ酸残基を、図３に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれＦｎ１０（Ｐ６）－ＦｃのようにＦｎ１０（環状ペプチド名）－Ｆｃと命名した。

[0075] Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を３ｍＬのＥｘｐｉ２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、細胞が3×10^6ｃｅｌ

Ｉｓ／ｍＬになるように播種した。その後、常法に従い、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｎｅ　２９３　Ｒｅａｇｅｎｔ（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、３μｇのＦｎ１０－Ｆｃ（あるいはその変異体）発現用ベクターを、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入後、３７℃、８％CO_2条件下、１２５ｒｐｍで細胞を１８時間振とう培養した。その後、ＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｍｅ　２９３　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅ　ｅｒ　１及びＥｘｐｉＦｅｃｔａｍｉｍｅ　２９３　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｅｎｈａｎｃｅｒ　２（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）をそれぞれ１５μＬ、１５０μＬ添加し、３７℃、８％CO_2条件下、１２５ｒｐｍで３日間振とう培養し、培養上清を回収した。

[0076] 回収した培養上清０．３ｍＬにプロテインＡ－セファロース（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を３０μＬ加え、２時間回転混和した。遠心分離によってセファロースを沈殿させて上清を除き、１ｍＬのＴｒｉｓ－ｂｕｆｆｅｒｅｄ　ｓａｌｉｎｅ（ＴＢＳ，２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，ｐＨ７．５）で３回セファロースを洗浄し、ＳＤＳサンプルバッファー２０μＬを加えて９５℃で２分間加熱して試料を溶出した。溶出した試料の５μＬを還元条件下で電気泳動に供し、クマシーブリリアントブルーで染色した。

[0077] 電気泳動の結果を図４に示す。図４において、サンプル番号は、丸数字で示す。Ｆｎ１０－Ｆｃ（サンプル番号１）は予想される分子量（３７．５ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、すべての環状ペプチド融合タンパク質（サンプル番号２～９）はそれよりも若干高い分子量を示し、全体のアミノ酸長として１２～２０残基長いことに呼応していた。いずれもペプチド挿入の無いＦｎ１０－Ｆｃと遜色ない量の環状ペプチド融合タンパク質がＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞から発現・分泌していることが確認された。

[0078] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

様々な環状ペプチドを融合したＦｎ１０－Ｆｃについて、融合前の環状ペ

プチドが有していた結合分子に対する結合能を保持しているかどうかを調べるため、プルダウン型の結合試験を行った。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐ．　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ，　２０１４，　９５，　２４０－２４７に記載された方法に準じて、４種類の結合分子（すべて一回膜貫通型の受容体）の細胞外領域のＣ末端にＰＡタグ（和光純薬工業社製）が付加された融合タンパク質をコードするコンストラクトを作成し、これを発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に組み込んだ。このベクターを用いて前述の方法によりＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞で一過性発現させ、可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡ、Ｍｅｔ－ＰＡ、ＥＧＦＲ－ＰＡ及びＴｒｋＢ－ＰＡをそれぞれ含む培養上清を調製した。

[0079] ＰＡタグを付加した受容体細胞外領域を含む培養上清０．５ｍＬに抗ＰＡタグ抗体であるＮＺ－１を固定化したセファロース（和光純薬工業社製）を３０μＬ加え、２時間回転混和することで結合分子をセファロースにキャプチャーした。遠心分離によってセファロースを沈殿させて除いた後、別に調製した各種の環状ペプチド融合タンパク質（Ｆｎ１０－Ｆｃ変異体）を含む培養上清を０．５ｍＬ加え、さらに２時間回転混和して反応させた。再び遠心分離によってセファロースを沈殿させ、１ｍＬのＴＢＳで３回セファロースを洗浄し、ＳＤＳサンプルバッファー２０μＬを加えて９５℃で２分間加熱して試料を溶出した。溶出した試料の５μＬを還元条件下で電気泳動に供し、クマシーブリリアントブルーで染色した。

[0080] 電気泳動の結果を図５に示す。プレキシンバインダーであるＰ６、ｍＰ６－９及びＰ７のアミノ酸配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号２～４）はＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡと、ＭｅｔバインダーであるａＭＤ４、ａＭＤ５及びａＭＬ５のアミノ酸配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号５～７）はＭｅｔ－ＰＡと、ＥＧＦ受容体バインダーであるＡ６－２ｆのアミノ酸配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号８）はＥＧＦＲ－ＰＡと、ＴｒｋＢバインダーであるｔｒｋＤ５のアミノ酸配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号９）はＴｒｋＢ－ＰＡと、それぞれ特異的

に結合することが、プルダウンの結果から明らかになった。

コントロールとして用いたＦｎ１０－Ｆｃ（サンプル番号１）はいずれの受容体タンパク質に対しても結合性を示さなかった。以上のことから、８種類の環状ペプチドは、すべてＦｎ１０のループ構造上に提示することでオリジナルの環状ペプチドの結合能を保持した融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0081]〔実施例２〕抗体のＦｃ領域と環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有するタンパク質としてヒトＩｇＧ由来Ｆｃ領域（以下、「Ｆｃ」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上でβストランドで挟まれたループ部分からＣα原子間距離が４～７Åの間にある２アミノ酸残基を探索した。その結果、Ｆｃのヒンジ領域に近い「上部」から３カ所、Ｆｃの「底部」から３カ所、Ｆｃの「側面部」から２カ所の計８カ所を選定した。融合に用いる部位の名称としては、「上部」からはＳｅｒ２６７（B_Nに相当）とＰｒｏ２７１（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ１サイト、Ｔｙｒ２９６（B_Nに相当）とＳｅｒ２９８（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ２サイト、Ｌｅｕ３２８（B_Nに相当）とＰｒｏ３３１（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ３サイト、と呼ぶ。「底部」からはＬｙｓ３６０（B_Nに相当）とＧｌｎ３６２（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ４サイト、Ｓｅｒ３８３（B_Nに相当）とＧｌｎ３８６（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ５サイト、Ｇｌｎ４１９（B_Nに相当）とＡｓｎ４２１（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ６サイト、と呼ぶ。「側面部」からはＧｌｙ３４１（B_Nに相当）とＰｒｏ３４３（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ７サイト、Ｓｅｒ４００（B_Nに相当）とＧｌｙ４０２（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ８サイト、と呼ぶ。これらの部分の立体構造を図６に示す。

[0082] Ｆｃの上部、底部、側面部において選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる領域の一部を、環状ペプチドｍＰ６－９、ａＭＤ４、あるいはａＭＤ５の可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドの融合後のループ部分のアミノ酸配列を図７～図９に示す。

[0083] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒトプロラクチンのシグナル配列をコードするＤＮＡ、Ｈｉｓｘ８タグをコードするＤＮＡ、ＭｙｃタグをコードするｃＤＮＡ、そしてヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡをつないでＦｃ融合タンパク質のコンストラクトを作成し、これを発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に組み込んだ。

[0084] Ｆｃ発現ベクターを元に、Ｌ１～Ｌ８サイトのループ領域のアミノ酸配列を、図７～図９に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれＦｃ（ｍＰ６－９＿Ｌ１）のようにＦｃ（環状ペプチド名＿サイト名）と命名した。

[0085] Ｆｃ及びその環状ペプチド融合タンパク質２０種（３種類のペプチドと８カ所の挿入部位バリエーション）について、実施例１において前述の方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞を用いた一過性発現を行い、培養上清からプロテインＡセファロースによって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図１０に示す。Ｆｃ（サンプル番号１）は予想される分子量（３０．６ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、すべての環状ペプチド融合タンパク質（サンプル番号２～２１）は３０～３７ｋＤａの分子量に相当する移動度を示すバンドとして現れた。

[0086] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（Ｆｃ変異体）について、実施例１において前述の方法によって可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡ及びＭｅｔ－ＰＡをキャプチャーしたＮＺ－１セファロースに対する結合をプルダウン法により調べた。

[0087] 電気泳動の結果を図１１に示す。プレキシンバインダーであるｍＰ６－９のアミノ酸配列を組み込んだ８種の融合タンパク質（サンプル番号２～９）のすべてがＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡと結合し、ＭｅｔバインダーであるａＭＤ４及びａＭＤ５のアミノ酸配列を組み込んだ１２種の融合タンパク質のうち１１種（サンプル番号１０～１３、１５～２１）がＭｅｔ－ＰＡと特異的に結合することが、プルダウンの結果から明らかになった（なお、Ｆｃ（ａＭＤ５＿Ｌ２、サンプル番号１４）についても特異的な結合は確認できた。）。すなわちＦｎ１０－Ｆｃの時と同様、ＩｇＧのＦｃ領域のループ構造上に直接挿入することによっても、環状ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0088] 〔実施例３〕ＩｇＧ抗体と環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有するタンパク質としてヒトＩｇＧ全長タンパク質（以下、「ＩｇＧ」と呼ぶ）を選択した。ＩｇＧはその構造の一部として実施例２において用いた足場タンパク質であるＦｃそのものを含むため、融合に用いる部位としては実施例２に示したＬ１～Ｌ８サイトをそのまま利用した。ＩｇＧとそのＦｃ領域（環状ペプチドの融合部位を含む）、及び２つの抗原結合部位であるＦａｂ領域の立体構造を図１２に示す。

[0089] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ニューロピリン１に対するヒトＩｇＧ１モノクローナル抗体のＨ鎖全長領域をコードするＤＮＡを発現ベクターｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ－１４（シグマ－アルドリッチ社製）に組み込んだ。同抗体のＬκ鎖全長領域をコードするＤＮＡも同様にｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ－１４ベクターに組み込んだ。

[0090] 上記ＩｇＧ１Ｈ鎖発現ベクターを元に、そのＦｃ領域のＬ１～Ｌ８サイトのループ領域のアミノ酸配列を、図７～図９に示す挿入配列に入れ替えたＨ鎖発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合Ｈ鎖のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれＩｇＧ（ｍＰ６－９__Ｌ１）のようにＩｇＧ（環状ペプチド名__サイト名）と命名した。

[0091] Ｈ鎖及びそのＰｌｅｘｉｎＢ１結合性環状ペプチド（ｍＰ６－９）融合変異体発現ベクターを、対応するＬκ鎖発現ベクターと１：１の比率で混合し、実施例２と同じ方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞に遺伝子導入して一過性発現を行い、発現分泌されるＩｇＧタンパク質を培養上清からプロテインＡセファロースによって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図１３Ａに示す。融合していないＩｇＧ（サンプル番号１）は予想される分子量（Ｈ鎖４７ｋＤａ、Ｌ鎖２５ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、すべての環状ペプチド融合タンパク質（サンプル番号２～９）はＨ鎖のみ４７ｋＤａよりわずかに高分子量に相当する移動度を示すバンド、Ｌ鎖は融合前のＩｇＧと同じ２５ｋＤａのバンドとして現れた。

[0092] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（ＩｇＧ変異体）について、実施例２において前述の方法によって可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡをキャプチャーしたＮＺ－１セファロースに対する結合をプルダウン法により調べた。

[0093] 電気泳動の結果を図１３Ｂに示す。プレキシンバインダーであるｍＰ６－９のアミノ酸配列を組み込んだ６種の融合タンパク質（サンプル番号２～９）のすべてがＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡと結合結合することが、プルダウンの結果から明らかになった。すなわちＦｃ単独の時と同様、ＩｇＧ中のＦｃ領域のループ構造上に直接挿入することによっても、環状ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0094]〔実施例４〕ヒト血清アルブミンと環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有するタンパク質としてヒト血清アルブミン（以下、「ＨＳＡ」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上でαヘリックスで挟まれたループ部分からＣα原子間距離が４～７Åの間にある２アミノ酸残基を探索した。その結果、ＨＳＡの分子上で溶媒露出度が高い４カ所を選定した。融合に用いる部位の名称としては、Ａｓｐ５６（B_Nに相当）とＡｌａ５９（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ１サイト、Ｃｙｓ１６９（B_Nに相当）とＬｙｓ１７４（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ２サイト、Ａｌａ３６３（B_Nに相当）とＰｒｏ３６６（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ３サイト、Ａｌａ５６１（B_Nに相当）とＬｙｓ５６４（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ４サイト、と呼ぶ。これらの部分の立体構造を図１４に示す。

[0095] ＨＳＡにおいて選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる領域の一部を、環状ペプチドｍＰ６－９及びａＭＤ４の可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドの融合後のループ部分のアミノ酸配列を図１５に示す。

[0096] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒト血清アルブミン全長をコードするＤＮＡ、Ｈｉｓｘ８タグをコードするＤＮＡ、Ｍｙｃタグをコードするを繋いでＨＳＡ融合タンパク質のコンストラクトを作成し、これを発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に組み込んだ。

[0097] ＨＳＡ発現ベクターを元に、Ｌ１～Ｌ４サイトのループ領域のアミノ酸配列を、図１２に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タ

ンパク質はそれぞれＨＳＡ（ｍＰ６－９__Ｌ１）のようにＨＳＡ（環状ペプチド名__サイト名）と命名した。

[0098] ＨＳＡ及びその環状ペプチド融合タンパク質８種（２種類のペプチドＸ４カ所の挿入部位バリエーション）について、実施例１において前述の方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞を用いた一過性発現を行い、Ｃ末端にＨｉｓタグが付加されていることを利用して培養上清からＮｉ－ＮＴＡアガロースによって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図１６に示す。ＨＳＡ（サンプル番号１）は予想される分子量（６７ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、すべての環状ペプチド融合タンパク質（サンプル番号２～９）はそれよりわずかに高分子量に相当する移動度を示すバンドとして現れた。

[0099] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（ＨＳＡ変異体）について、実施例１において前述の方法によってＰｌｅｘｉｎＢ１及びＭｅｔの可溶性受容体断片との結合を確認した。ただし、ｍＰ６－９ペプチド融合タンパク質においては、結合分子としてＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡではなくＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃタンパク質を用い、プルダウンのビーズもＮＺ－１－ＳｅｐｈａｒｏｓｅではなくプロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅを用いた。

[0100] 電気泳動の結果を図１７に示す。プレキシンバインダーであるｍＰ６－９のアミノ酸配列を組み込んだ４種の融合タンパク質のすべて（サンプル番号２～５）がＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃと結合し、ＭｅｔバインダーであるａＭＤ４のアミノ酸配列を組み込んだ４種の融合タンパク質（サンプル番号６～９）についても４種のすべてがＭｅｔ－ＰＡと特異的に結合することが、プルダウンの結果から明らかになった。環状ペプチドを融合していないＨＳＡ（サンプル番号１）ではＨＳＡタンパク質を全く含まないコントロール培養上清（サンプル番号１０）でも見られる非特異的バンドのみが共沈降し、結合しないことが確認された。すなわちＦｎ１０－Ｆｃ、Ｆｃの時と同様、ＨＳＡのαヘリックスに挟まれたループに直接挿入することによっても、環状

ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0101] 〔実施例５〕ヒト成長ホルモンと環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、ループ構造を持つタンパク質としてヒト成長ホルモン（以下、「ｈＧＨ」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上でαヘリックスで挟まれたループ部分からＣα原子間距離が４～７Åの間にある２アミノ酸残基を探索した。その結果、ｈＧＨの分子構造上、長軸の先端に相当する２カ所を選定した。融合に用いる部位の名称としては、Ａｓｐ１３０（B_Nに相当）とＳｅｒ１３２（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ１サイト、Ａｓｎ１５２（B_Nに相当）とＡｓｐ１５４（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ２サイト、と呼ぶ。これらの部分の立体構造を図１８に示す。

[0102] ｈＧＨにおいて選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる領域の一部を、環状ペプチドｍＰ６－９の可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドの融合後のループ部分のアミノ酸配列を図１９に示す。

[0103] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒト成長ホルモン発現ベクターはｈＧＨ全長のＣ末端にＨｉｓｘ８タグとＴＥＶプロテアーゼ認識配列を付加したｐＳＧＨＶ０（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒ． Ｐｕｒｉｆ．，２０００， ２０（３）， ５００－５０６に記載）を用いた。このベクターを元に、Ｌ１～Ｌ２サイトのループ領域のアミノ酸配列を、図１９に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれｈＧＨ（ｍＰ６－９＿Ｌ１）のようにｈＧＨ（環状ペプチド名＿サイト名）と命名した。

[0104] ｈＧＨ及びその環状ペプチド融合タンパク質２種（１種類のペプチドＸ２カ所の挿入部位バリエーション）について、実施例１において前述の方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞を用いた一過性発現を行い、培養上清からＮｉ－ＮＴＡアガロースによって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図２０Ａに示す。ｈＧＨ（サンプル番号１）は予想される分子量（２６ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、２つの環状ペプチド融合体（サンプル番号２及び３）はそれよりわずかに高分子量に相当する移動度を示すバンドとして現れた。

[0105] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（ｈＧＨ変異体）について、実施例１において前述の方法によって可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡをキャプチャーしたＮＺ－１セファロースに対する結合をプルダウン法により調べた。

電気泳動の結果を図２０Ｂに示す。野生型のｈＧＨ（サンプル番号１）はＰｌｅｘｉｎＢ１－ＰＡと結合しないが、プレキシンバインダーであるｍＰ６－９の配列を組み込んだ２種の融合タンパク質（サンプル番号２及び３）は特異的に結合することが、プルダウンの結果から明らかになった。すなわちＦｎ１０－Ｆｃ、Ｆｃ、ＨＳＡの時と同様、分泌ホルモンであるｈＧＨのループに直接挿入することによっても、環状ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0106] 〔実施例６〕ヒト血清レチノール結合タンパク質と環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有する脂質結合タンパク質としてヒト血清レチノール結合タンパク質（以下、「ＲＢＰ」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上でβストランドで挟まれたループ部分からＣα原子間距離が４～７Åの間にある２アミノ酸残基を探索した。その結果、ＲＢＰのβバレル構造から突出するヘ

アピンループ２カ所を選定した。融合に用いる部位の名称としては、Ｌｅｕ６４（B_Nに相当）とＴｒｐ６７（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ１サイト、Ａｌａ９４（B_Nに相当）とＬｅｕ９７（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基とする場合をＬ２サイト、と呼ぶ。これらの部分の立体構造を図２１に示す。

[0107] ＲＢＰにおいて選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる領域の一部を、環状ペプチドｍＰ６－９の可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドの融合後のループ部分のアミノ酸配列を図２２に示す。

[0108] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒトＲＢＰ発現ベクターは、ＲＢＰ全長をコードするＤＮＡとＰＡタグをコードするＤＮＡをつないで作成し、これを発現ベクターｐｃＤＮＡ３．１（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に組み込んだ。このベクターを元に、Ｌ１～Ｌ２サイトのループ領域のアミノ酸配列を、図２２に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれＲＢＰ（ｍＰ６－９__Ｌ１）のようにＲＢＰ（環状ペプチド名__サイト名）と命名した。

[0109] ＲＢＰ及びその環状ペプチド融合タンパク質２種（１種類のペプチドＸ２カ所の挿入部位バリエーション）について、実施例１において前述の方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞を用いた一過性発現を行い、培養上清からＰＡタグに対する抗体であるＮＺ－１を固定化したセファロース（和光純薬工業社製）によって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図２３Ａに示す。ＲＢＰ（サンプル番号１）は予想される分子量（２５ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、２つの環状ペプチド融合体（サンプル番号２及び３）はそれよりわずかに高分子量に相当する移動度

を示すバンドとして現れた。

[0110] ３．環状ペプチド融合タンパク質の調製と結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（ＲＢＰ変異体）について、前述と同様の方法によって可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃをキャプチャーしたプロテイン Ａセファロースに対する結合をプルダウン法により調べた。

電気泳動の結果を図２３Ｂに示す。野生型のＲＢＰ（サンプル番号１）はＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃと結合しないが、プレキシンバインダーであるｍＰ６－９の配列を組み込んだ２種の融合タンパク質（サンプル番号２及び３）は特異的に結合することが、プルダウンの結果から明らかになった。すなわちＦｎ１０－Ｆｃ、Ｆｃ、ＨＳＡ、ｈＧＨの時と同様、脂質結合性分泌タンパク質であるＲＢＰのループに直接挿入することによっても、環状ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0111] 〔実施例７〕ヒト胎盤型アルカリフォスファターゼと環状ペプチドの融合

１．環状ペプチド融合タンパク質のデザイン

生理活性環状ペプチドの化学架橋構造と置き換えるため、足場タンパク質となるループ構造を有する酵素タンパク質としてヒト胎盤型アルカリフォスファターゼ（以下、「ＰＬＡＰ」と呼ぶ）を選択し、その立体構造上で酵素活性部位から離れたループ部分からＣα原子間距離が５．５ÅであるＬｙｓ４０４（B_Nに相当）とＧｌｙ４０６（B_Cに相当）の２アミノ酸残基を連結残基として選定した。この部分の立体構造を図２４に示す。

[0112] ＰＬＡＰにおいて選定したB_NとB_Cの２アミノ酸残基によって挟まれる領域の一部を、環状ペプチドｍＰ６－９及びａＭＤ４の可変領域のアミノ酸配列の両側に適宜任意のリンカーアミノ酸を追加したもので置き換えた融合タンパク質をデザインした。デザインした融合タンパク質における、環状ペプチドの融合後のループ部分のアミノ酸配列を図２５に示す。

[0113] ２．環状ペプチド融合タンパク質の調製

ヒト胎盤型アルカリフォスファターゼ発現ベクターはＰＬＡＰ全長のＣ末端にＭｙｃタグとＨｉｓｘ６タグを付加したｐＡＰｔａｇ－５ベクター（Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．　２０００，　３２７，　１９－３５に記載）を用いた。このベクターを元に、ループ部分を図２５に示す挿入配列に入れ替えた発現ベクターを作製した。挿入配列部分はｅｘｔｅｎｓｉｏｎ　ＰＣＲ法を用いて増幅し、目的とする各種の環状ペプチド融合タンパク質のコンストラクトを得た。環状ペプチド融合タンパク質はそれぞれＰＬＡＰ（ｍＰ６－９）のようにＰＬＡＰ（環状ペプチド名）と命名した。

[0114] ＰＬＡＰ及びその環状ペプチド融合タンパク質２種（２種類のペプチドＸ１カ所の挿入部位）について、実施例１において前述の方法によってＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞を用いた一過性発現を行い、培養上清からＮｉ－ＮＴＡアガロースによって沈降させてＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析をおこなった。

電気泳動の結果を図２６に示す。ＰＬＡＰ（サンプル番号１）は予想される分子量（７４ｋＤａ）の位置にバンドが見られ、２つの環状ペプチド融合タンパク質（サンプル番号２及び３）はそれよりわずかに高分子量に相当する移動度を示すバンドとして現れた。

[0115] ３．環状ペプチド融合タンパク質の結合分子に対する結合

得られた環状ペプチド融合タンパク質（ＰＬＡＰ変異体）について、実施例１において前述の方法によって可溶性受容体断片であるＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃ及びＭｅｔ－Ｆｃをキャプチャーしたプロテイン Ａセファロースに対する結合をプルダウン法により調べた。

電気泳動の結果を図２７に示す。野生型のＰＬＡＰ（サンプル番号１）はＰｌｅｘｉｎＢ１－ＦｃやＭｅｔ－Ｆｃと結合しないが、プレキシンバインダーであるｍＰ６－９の配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号２）はＰｌｅｘｉｎＢ１－Ｆｃと、ａＭＤ４の配列を組み込んだ融合タンパク質（サンプル番号３）はＭｅｔ－Ｆｃと、それぞれ特異的に結合することがプルダウンの結果から明らかになった。すなわちＦｎ１０－Ｆｃ、Ｆｃ、ＨＳＡ、ｈＧＨ、ＲＢＰの時と同様、酵素タンパク質であるＰＬＡＰのループ

に直接挿入することによっても、環状ペプチドはその結合分子に対する結合活性を保持したまま融合タンパク質に変換できることが確認された。

[0116] 〔実施例８〕環状タンパク質融合ペプチドの生理活性

プレキシンＢ１バインダーペプチドであるＰ６及びその類縁体であるｍＰ６－９は、細胞上に発現したプレキシンＢ１に結合してそのシグナル伝達を阻害する。この阻害活性がタンパク質に融合した状態でも発揮されるかどうかしらべるため、セマフォリン４Ｄ（Ｓｅｍａ４Ｄ）刺激時のプレキシンＢ１発現細胞の形態変化に与える影響を評価した。

[0117] 細胞の形態変化はｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ ＲＴＣＡ ＤＰ装置（ＡＣＥＡ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）を用いたインピーダンス法により測定した。プレキシンＢ１安定発現細胞（Ｃｅｌｌ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ，２０１６，２３，１３４１－１３５０に記載）を６，０００ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌの濃度でＥ－ＰｌａｔｅＶｉｅｗ１６ＰＥＴプレート（ＡＣＥＡ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社製）に播種し、３７℃で２０時間培養した。次に培地中に、実施例２で記載したｍＰ６－９ペプチド融合タンパク質を１ｎＭ～１μＭの範囲で加えてさらに３０分間保温したのち、刺激剤としてＳｅｍａ４Ｄ－Ｆｃタンパク質（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を終濃度１ｎＭで加え、セルのインピーダンスをモニターした。

[0118] 結果を図２８に示す。Ｓｅｍａ４Ｄ－Ｆｃの添加後すぐにインピーダンスの急速な低下が起こり、細胞の形態変化が起こって接着面積が退縮することがわかる。一方、６種類の融合タンパク質で前処理した細胞では、加えた融合タンパク質の濃度に依存して細胞の形態変化が抑制され、すべての融合タンパク質が１００ｎＭ以上においてほぼ完全にプレキシンＢ１の活性化をブロックすることが明らかになった。すなわち、環状ペプチドの状態でｍＰ６－９が有していたプレキシンＢ１シグナル阻害剤としての効力が、融合タンパク質に変換された後も保たれていることが明らかになった。

請求の範囲

[請求項1] 環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質上に提示する方法であって、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えることにより、環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させることを含む、方法。

[請求項2] ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基のＣα原子間距離が、４～７Åの範囲内にある、請求項１に記載の方法。

[請求項3] ループ構造を有するタンパク質が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基の間に１～１５アミノ酸残基を有する、請求項１又は２に記載の方法。

[請求項4] 環状ペプチドが、タンパク質性アミノ酸及び／又は非タンパク質性アミノ酸からなる、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 化学架橋構造が、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項6] ２以上の環状ペプチドが、複数のループ構造を有するタンパク質の異なるループ構造にそれぞれ融合する、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項7] ２以上の環状ペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する、請求項６に記載の方法。

[請求項8] ２以上の環状ペプチドが、異なるアミノ酸配列を有する、請求項６に記載の方法。

[請求項9] 環状ペプチドの化学架橋構造を、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換える際に、リンカー配列を介して環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

[請求項10] ループ構造を構成する２つのアミノ酸以外のループ構造を構成するアミノ酸配列を含んで、環状ペプチドの化学架橋構造が、ループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に置き換えられる、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。

[請求項11] 環状ペプチドを、ループ構造を有するタンパク質に融合させて環状ペプチドをタンパク質上に提示させた改変タンパク質の製造方法であって、

環状ペプチドは、分子内環状構造を形成するための化学架橋構造を有し、

環状ペプチドのアミノ酸配列から、タンパク質上に提示させる部分アミノ酸配列を選択し、該部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を選択し、

ループ構造を有するタンパク質のループ構造を構成する２つのアミノ酸残基に相当する塩基配列を選択し、該選択された塩基配列間に存在する塩基を必要に応じて削除し、選択された環状ペプチドの部分アミノ酸配列に相当する塩基配列を挿入して組み込んだ塩基配列を有する核酸を準備し、

該核酸を翻訳する、改変タンパク質の製造方法。

[請求項12] 請求項１１に記載の製造方法により得られる改変タンパク質。