

Title	環状ペプチドライブラリーの固相合成とリポ多糖結合ペプチドのスクリーニング
Author(s)	森, 直人
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3015
Rights	
Description	Supervisor:横山 憲二, 材料科学研究科, 修士

環状ペプチドライブラリーの固相合成とリポ多糖結合ペプチドのスクリーニング

森 直人（横山研究室）

【目的】

環状ペプチドは、特定の安定な構造を有するため、直鎖状ペプチドよりもターゲット分子に対する親和性が高いという報告が多く、分子認識素子として期待されている。一方、ターゲットに対して親和性の高いペプチドを選択するには、スプリット合成法により固相上にライブラリーを作製する方法がある。固相合成の特徴としては、ライブラリー構築に時間がかからない、スクリーニングが容易である、有機溶媒が使用できるなどがあげられる。本研究では、スプリット合成法によってオンビーズ環状ペプチドライブラリーを作製し、リポ多糖（LPS：lipopolysaccharide）に結合するペプチドをスクリーニングすることを目的とした。LPS はグラム陰性菌の外膜に存在する内毒素（エンドトキシン）であり、医療現場などでの混入は生命に関わる大変な問題となる。また LPS は免疫機能に対しても様々な影響を与え、LPS の機能の解明が広く望まれている。そのため、LPS を認識するペプチドを獲得することは、LPS の検出や LPS の機能を解明するためのツールとして期待できると考える。

【実験方法】

ペプチドライブラリーは、コンビナトリアルケミストリーの手法の一つであるスプリット合成法を用いることにより固相上に作製した。ペプチドのアミノ酸配列は Resin-linker-C-A-X-X-X-X-A-C、X の部位の 5 残基を 8 種類（X=P, R, I, L, G, K, F, Q）のアミノ酸 でランダム化した。ペプチドは Fmoc 固相合成法により調製した。ペプチドの環状化は、20%ジメチルスルホキシドを含む 20mM 酢酸アンモニウム（pH 8.0）緩衝溶液中で 2 日間行い、システイン側鎖のチオール基を自然酸化し、ジスルフィド結合を生成させた。環状ペプチドの合成確認は、質量分析（MALDI-TOF-MS）および Ellman 試薬を用いた SH 基の定量によって行った。スクリーニングは、蛍光物質（Alexa Fluor 488）を修飾した LPS とビーズを混合し、洗浄操作の後、蛍光顕微鏡を用いて 495nm で励起し 519nm の蛍光を観察することで行った。強い蛍光を示すビーズを取得し、プロテインシーケンサーでペプチドの配列を決定した。スクリーニングした配列のペプチドをあらためて合成し、表面プラズモン共鳴（SPR）装置を用いて LPS との親和性を測定した。SPR では固定化リガンドにペプチド、アナライトに LPS を用いた。

【結果と考察】

質量分析とエルマン試薬を用いた SH 基の定量を行い、環状ペプチドに相当する質量値と SH 基の酸化を確認した。また、オンビーズ環状ペプチドライブラリーと蛍光修飾 LPS を混合、洗浄後、蛍光顕微鏡により観察したところ、強い蛍光を示すビーズが確認された。プロテインシーケンサーによりスクリーニングで得た 8 種類のアミノ酸配列を決定した。SPR 測定によりペプチドと LPS の解離定数を求めた結果、LPS に対して高い親和性を示す環状ペプチドをスクリーニングできたことが示された。

【Keyword】

リポ多糖（LPS） スプリット合成 環状ペプチド 表面プラズモン共鳴 分子認識
オンビーズスクリーニング