PURE*frexRD*による機能性環状ペプチドの網羅的親水化改変
Comprehensive improvement of hydrophilicity for functional cyclic peptide using PURE*frexRD*

中村美紀子、加藤静恵、村上智史、對比地久美子、○古城周久

Mikiko Nakamura, Shizue Katoh, Satoshi Murakami, Kumiko Tsuihiji, Kanehisa Kojoh

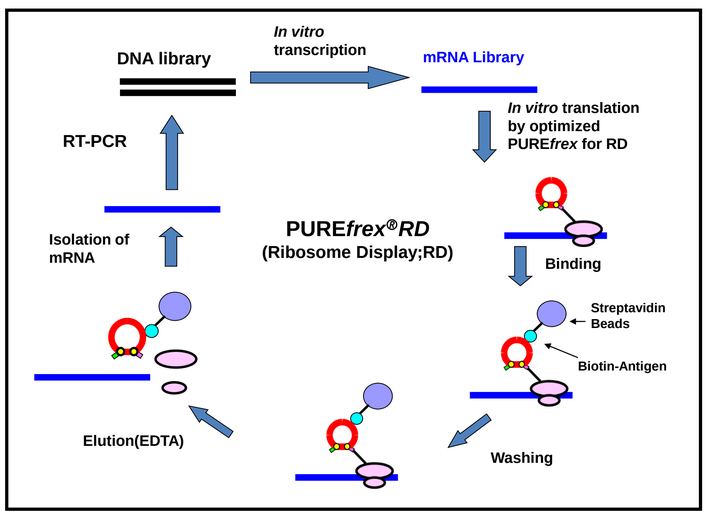
ジーンフロンティア（株）

Abstract

[Background] Ribosome display (PURE*frex®RD*) is a very effective selection technique for functional peptides. However, since a peptide is presented on the ribosome, which is a large molecule, its properties (hydrophobicity, isoelectric point, etc.) are offseted by the ribosome. Therefore, even if a functional peptide can be selected in the ribosome display form, the hydrophobicity is too high, resulting in the inability to synthesize the peptide itself. In this study, we investigated a method to introduce hydrophilic amino acids into highly hydrophobic peptides comprehensively using PURE*frex®RD*.

[Methods and Results] Cyclic peptides binding to IL6, previously selected by PURE*frex®RD*, were used in the experiments. The peptide consists of 20 amino acid residues including cysteines at N and C ends and was cyclized by disulfide bonds. First, amino acid residues essential for binding activity were identified by alanine scanning using PURE*frex®RD*, it found that 10 of the 18 amino acids were essential for binding. Next, for the 8 amino acids that were not essential, a library randomized with VRW codons without hydrophobic amino acid codons was prepared, and performed selection experiments with a view of getting the hydrophilic cyclic peptides. After 2 rounds of selection experiments, the increase in mRNA recovery could not be observed, it was expected that changing all 8 amino acids to VRW codons would have a negative effect on binding activity. Therefore, a library (8 species) in which one of the 8 VRW-amino acids was randomized with the NNS codon were prepared and two rounds of selection experiments were performed. As a result, an increase in the amount of well recovered mRNA could be observed. The cyclic peptides were expressed as MBP fusion proteins by PURE*frex* from the recovered mRNAs, and the binding activity was confirmed by ELISA. The sequence analysis results showed that many peptides were more hydrophilic than the original peptides. These results indicate that PURE*frex®RD* can comprehensively modify highly hydrophobic peptides into hydrophilic peptides.

① リボソームディスプレイ（PURE*frex®RD*)による環状ペプチドの *In vitro* selection



特徴）

1，PURE*frex®RD*は1ラウンドあたり1X10^{14}の多様用を持つライブラリからの選択が可能。

2，*In vitro* selectionの開始から濃縮配列解析までを含め最短で10日間で複数のバインダーを取得することができる。

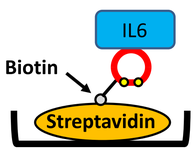
3，Phage displayのような感染操作が無いため、容易に複数のライブラリの同時選択が可能。

② IL6 binder 環状ペプチドの特徴

IL6 binder peptide

Sequence：CEVVLSRLWEPGFSWYLYTC

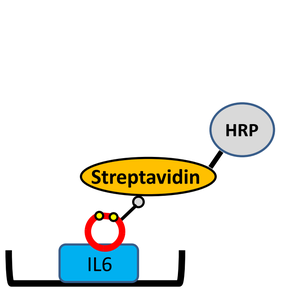
1) ペプチドをSAセンサーチップに固定した状態での結合活性（KD値）をBLItzで測定した。

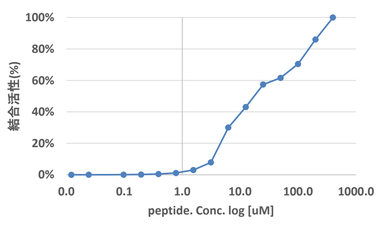


Ka [1/Ms]	Kd [1/s]	R2
6.45E-8	1.93E-4	0.9991

KD値：64.5 nM

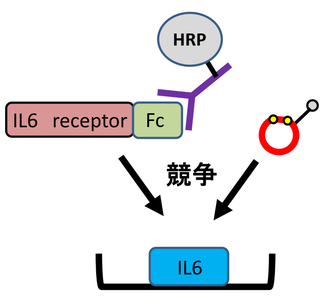
2)ペプチド遊離状態での結合活性をELISA(EC50)で測定した。

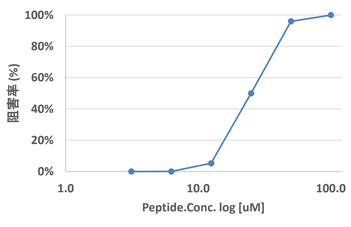




EC50：18.6 μM

3)ペプチド遊離状態での相互作用阻害活性を競争ELISA（IC50）で測定した。





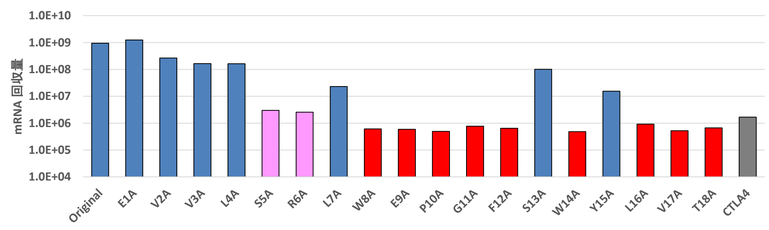
IC50：25.0 μM

③ アラニンスキャニングによる抗原結合に必要なアミノ酸残基の同定

アラニンスキャニング用ライブラリ

CEVVLSRLWEPGFSWYLYTC
CAVVLSRLWEPGFSWYLYTC
CEAVLSRLWEPGFSWYLYTC
⋮
CEVVLSRLWEPGFSWYLYAC

↓ PURE*frex®RD* pull down



抗原結合に必要なアミノ酸残基はTrp8, Glu9, Pro10, Gly11, Phe12, Trp14, Leu16, Val17, Thr18 (red bar)。結合力に影響が出そうなアミノ酸残基はSer5, Arg6 (pink bar)。そのほかGlu1, Val2, Val3, Leu4, Leu7, Ser13, Tyr15（blue bar）は抗原結合に関与しないアミノ酸残基であることが確認された。

④ 親水化ライブラリーと選択実験

抗原結合に必須なアミノ酸残基（赤枠）以外の場所にVRWまたはNNSコドンを導入した。

VRW-Library 1

Original clone	C	E	V	V	L	S	R	L	W	E	P	G	F	S	W	Y	L	V	T	C
VRW-Library1	C	VRW	VRW	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C

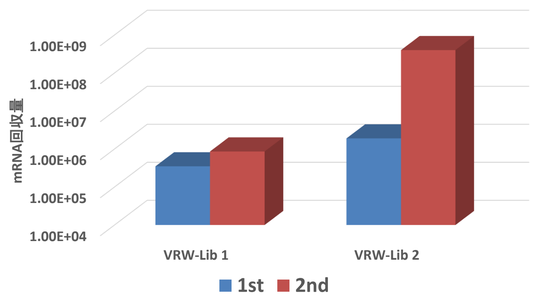
VRW-Library 2

Original clone	C	E	V	V	L	S	R	L	W	E	P	G	F	S	W	Y	L	V	T	C
VRW-Library2	C	NNS	VRW	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	NNS	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	NNS	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	VRW	NNS	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	VRW	VRW	S	NNS	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	VRW	VRW	S	VRW	NNS	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	NNS	W	VRW	L	V	T	C
	C	VRW	VRW	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	NNS	L	V	T	C

V: A or C or G,　R: S or G,　W: A or T,　N: A or C or G or T,　S: C or G

VRWに対応するアミノ酸：S, N, Q, G, D, E, R, K, H

PURE*frex®RD*による選択実験



VRW-Library 1では2ラウンドの選択実験ではmRNAの濃縮が認められなかったが、VRW-Library 2では良好な濃縮が確認された。

⑤ MBP-fusionとしての結合活性と配列解析

方法：VRW-Library 2の2nd roundをN末MBP fusionペプチドとしてサブクローニング

↓

配列解析

↓

PURE*frex®*または大腸菌で発現後ELISAで結合活性確認。検出はAnti-FLAG M2 HRPで測定した。

hydrophilic	D	E	K	H	R			
neutral	S	T	N	Q	C	Y		
hydrophobic	A	V	G	I	L	F	P	W	M

PURE*frex* ELISA			E.coli Lysate ELISA			name		VRW	VRW	VRW	VRW	VRW	VRW					VRW		VRW					hydrophilic	neutral	hydrophobic	PI	EC50 [nM] MBP-fusion	EC50 [μM] 合成ペプチド
IL6	SA	S/N	IL6	SA	S/N	Original	C	E	V	V	L	S	R	L	W	E	P	G	W	S	W	Y	L	V	T	C	3	4	11	4.30		
0.38	0.04	9.2	0.17	0.07	2.2	VRW-14	C	R	R	E	K	S	D	R	W	E	P	G	F	I	W	H	L	V	T	C	8	2	8	8.30		
0.40	0.06	6.6	0.87	0.36	2.4	VRW-08	C	R	R	E	R	S	D	R	W	E	P	G	F	I	W	H	L	V	T	C	8	2	8	8.30		
0.43	0.03	12.7	0.12	0.06	2.2	VRW-05	C	R	W	E	H	S	E	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	8	2	8	7.16		
0.69	0.05	13.2	0.29	0.06	4.9	VRW-71	C	R	H	E	K	S	D	K	W	E	P	G	F	V	W	H	L	V	T	C	8	2	8	7.15	307.09	ND
0.58	0.02	25.4	0.69	0.06	11.5	VRW-30	C	K	H	E	R	S	E	H	W	E	P	G	F	V	W	H	L	V	T	C	8	2	8	6.31	328.71	ND
0.68	0.04	19.4	0.52	0.07	7.2	VRW-61	C	H	W	E	H	S	D	E	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	8	2	8	5.18	120.02	ND
0.48	0.04	12.4	0.25	0.05	5.3	VRW-85	C	R	H	E	S	S	V	K	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	7.16	912.68	ND
0.41	0.06	7.4	0.07	0.11	0.6	VRW-15	C	R	R	E	W	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	7.00	200.01	ND
0.81	0.03	24.8	1.71	0.07	24.8	VRW-67	C	E	V	E	S	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.67	328.71	ND
0.85	0.05	17.7	1.13	0.05	24.9	VRW-79	C	E	V	E	S	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.67	692.93	ND
0.78	0.02	34.6	1.15	0.09	12.9	VRW-27	C	E	V	E	S	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.67	56.71	ND
0.88	0.04	24.2	0.93	0.05	17.5	VRW-91	C	H	I	E	H	S	D	S	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	5.75		
0.94	0.03	33.7	1.56	0.07	21.6	VRW-38	C	H	V	E	S	S	D	H	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	5.75		
0.83	0.90	0.9	1.48	0.72	2.1	VRW-51	C	H	V	E	S	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	6.03		
0.60	0.03	17.4	1.70	0.06	26.7	VRW-42	C	K	H	E	V	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	6.03		
0.51	0.06	9.0	0.44	0.14	3.1	VRW-81	C	N	H	E	E	S	L	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.65		
0.68	0.03	24.0	0.38	0.05	7.9	VRW-84	C	R	L	E	S	S	E	H	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	6.04		
0.54	0.03	17.1	0.21	0.05	4.4	VRW-92	C	E	W	E	R	S	D	N	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.67		
0.35	0.02	14.9	0.07	0.04	1.8	VRW-62	C	K	W	E	H	S	N	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	6.03		
0.58	0.03	19.3	0.14	2.13	0.1	VRW-94	C	Q	H	E	E	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	I	L	V	T	C	7	3	8	4.67		
0.37	0.03	10.9	0.41	0.06	6.6	VRW-58	C	K	S	E	E	S	E	S	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.42		
0.61	0.04	14.7	0.64	0.05	11.6	VRW-49	C	R	T	E	S	S	D	S	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.37		
0.47	0.03	18.3	0.37	0.76	0.5	VRW-19	C	Q	K	E	S	S	D	N	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.37		
0.42	0.06	6.6	0.30	0.08	3.9	VRW-09	C	S	R	E	S	S	Y	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.37		
0.73	0.04	20.5	0.25	0.05	5.0	VRW-31	C	S	R	E	S	S	Y	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.37		
0.72	0.04	16.9	0.04	0.12	0.3	VRW-23	C	Q	Y	E	S	S	E	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	5	7	5.42		
0.38	0.05	8.2	0.05	0.05	1.1	VRW-07	C	K	Q	K	S	S	R	E	W	E	P	G	F	R	W	C	L	V	T	C	6	5	7	8.29		
0.76	0.03	25.5	2.52	0.24	10.7	VRW-77	C	H	M	E	S	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20		
0.96	0.06	15.5	1.79	0.07	25.7	VRW-80	C	H	V	E	S	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20		
0.57	0.04	14.5	0.37	0.07	5.4	VRW-75	C	Q	H	E	Q	S	D	R	W	E	P	G	F	L	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20		
0.60	0.03	21.6	0.78	0.05	15.1	VRW-35	C	Q	H	E	S	S	L	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20		
0.72	0.06	12.5	0.77	0.07	10.6	VRW-33	C	R	I	E	S	S	E	N	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.42		
0.77	0.02	30.9	0.50	0.07	7.7	VRW-03	C	R	W	E	S	S	D	S	W	E	P	G	F	K	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.37		
0.57	0.07	8.2	0.52	0.14	3.8	VRW-89	C	S	M	E	S	S	H	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20		
0.74	0.04	20.9	0.97	0.07	13.3	VRW-21	C	S	V	E	S	S	E	K	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.42		
0.46	0.03	16.0	0.34	0.06	6.1	VRW-44	C	R	S	H	E	S	G	Y	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	7.15		
0.60	0.03	21.2	0.98	0.13	7.3	VRW-68	C	H	M	Q	S	S	D	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.13		
0.61	0.06	10.1	0.39	0.10	3.7	VRW-72	C	R	R	Q	S	S	D	K	W	E	P	G	F	V	W	H	L	V	T	C	6	4	8	8.30		
0.47	0.05	9.8	0.41	0.04	10.3	VRW-60	C	S	I	R	S	S	D	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.30		
0.62	0.05	11.9	0.51	0.32	1.6	VRW-47	C	R	R	E	S	S	E	N	W	E	P	G	F	L	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.42		
0.34	0.04	7.8	0.09	0.05	1.9	VRW-69	C	R	S	E	S	S	D	K	W	E	P	G	F	V	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.37		
0.35	0.04	8.5	0.21	0.05	4.5	VRW-82	C	R	W	E	H	S	N	S	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	7.15		
0.30	0.03	8.9	0.07	0.06	1.3	VRW-06	C	S	R	E	S	S	D	D	W	E	P	G	F	R	W	F	L	V	T	C	6	4	8	4.10		
0.64	0.06	11.3	0.87	0.16	5.4	VRW-32	C	R	H	E	E	S	G	Q	W	E	P	G	F	M	W	H	L	V	T	C	6	3	9	5.25		
0.40	0.04	10.1	0.31	0.07	4.5	VRW-34	C	R	H	E	E	S	G	Q	W	E	P	G	F	M	W	H	L	V	T	C	6	3	9	5.25		
0.35	0.06	5.8	0.25	0.10	2.6	VRW-24	C	Q	H	E	S	S	S	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	5	6	7	7.00		
0.78	0.04	18.1	0.74	0.04	20.3	VRW-57	C	S	I	E	S	S	N	D	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	5	5	8	4.46		
0.58	0.01	42.1	0.15	0.04	4.1	VRW-45	C	K	W	Q	S	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	5	5	8	6.99		
0.52	0.03	17.7	0.13	0.11	1.2	VRW-22	C	S	L	E	S	S	R	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	5	5	8	7.90		
0.40	0.04	10.9	0.05	0.04	1.4	VRW-63	C	S	V	E	S	S	E	N	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	5	5	8	4.58		
0.69	0.03	27.0	2.66	0.27	9.9	VRW-04	C	H	V	E	S	S	R	N	W	E	P	G	F	L	W	H	L	V	T	C	5	4	9	6.02		
0.37	0.03	10.6	0.05	0.09	0.6	VRW-78	C	S	S	K	D	S	G	F	W	E	P	G	F	R	W	I	L	V	T	C	5	4	9	6.99		
0.45	0.02	18.3	0.39	1.38	0.3	VRW-83	C	K	I	E	K	S	R	N	W	E	P	G	F	L	W	I	L	V	T	C	5	3	10	8.29		
0.76	0.03	24.6	0.42	0.76	0.6	VRW-39	C	R	W	E	S	S	S	Q	W	E	P	G	F	N	W	H	L	V	T	C	4	6	8	5.32		
0.33	0.03	12.7	0.28	1.08	0.3	VRW-36	C	S	V	K	H	S	G	N	W	E	P	G	L	G	W	H	L	V	T	C	4	4	10	7.15		
0.48	0.03	16.2	0.11	0.06	1.8	VRW-37	C	N	W	E	S	S	N	Q	W	E	P	G	F	Q	W	H	L	V	T	C	3	7	8	4.29		
0.59	0.03	23.2	0.79	0.06	12.8	VRW-59	C	S	Y	E	S	S	N	L	W	E	P	G	W	T	W	Y	L	V	T	C	2	8	8	2.84		
0.65	0.03	19.9	0.23	0.32	0.7	VRW-87	C	S	Y	E	S	S	N	L	W	E	P	G	W	T	W	Y	L	V	T	C	2	8	8	2.84		
0.47	0.02	19.6	0.23	0.05	4.9	VRW-18	C	S	Y	E	S	S	N	L	W	E	P	G	W	T	W	Y	L	V	T	C	2	8	8	2.84		

結果

・大腸菌で発現するよりもPURE*frex®*で発現した方がより安定に結合活性を維持できる。（Original cloneは大腸菌、PURE*frex®*発現ともに結合活性が確認できなかった。）

・様々な等電点を持つペプチドの選択が可能であるが、塩基性ペプチドは結合活性が低めになる傾向がある。

⑥ アミノ酸の出現頻度

アミノ酸出現頻度

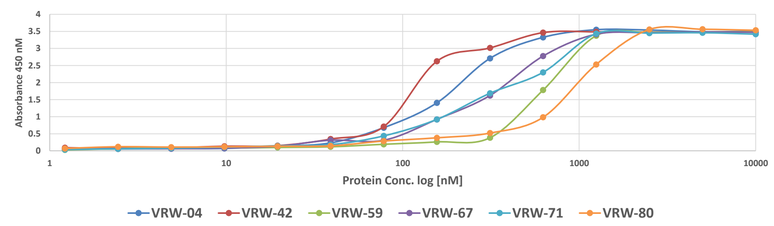
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	VRW	VRW	VRW	VRW	S	VRW	VRW	W	E	P	G	F	VRW	W	VRW	L	V	T
D	0	0	0	1	0	26	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	4	0	51	5	0	9	2	0	59	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	8	11	1	6	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	52	0	0	0
K	7	1	3	3	0	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
R	18	8	1	3	0	4	10	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0
N	2	0	0	0	0	7	8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Q	6	1	3	1	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S	14	4	0	38	59	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	59
Y	0	4	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	55	0	0	1	0	0	0
G	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	59	0	1	0	0	0	0	0
I	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
L	0	2	0	0	0	2	3	0	0	0	0	1	4	0	0	59	0	0
M	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0	0	0	0	0	0	0	0
V	0	10	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	59	0
W	0	9	0	1	0	0	0	59	0	0	0	3	0	59	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

赤字はOriginal由来のアミノ酸。1,2,7位は比較的多種類のアミノ酸の導入が許される。3,4,6,13,15位（赤枠）は特定のアミノ酸が導入される確率が高い。2,13,15位には酸性アミノ酸は導入されにくく、逆に3,6位は導入されやすい傾向がある。

⑦ MBP-fusionペプチドおよび合成ペプチドのEC50測定

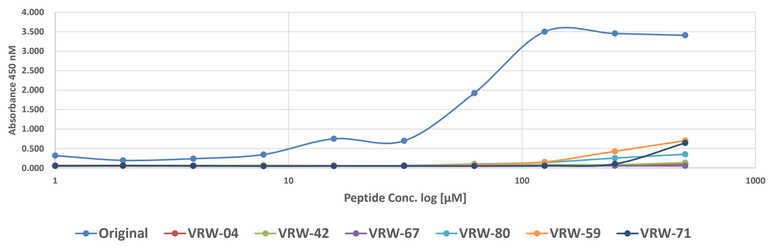
MBP-fusion ペプチド

大腸菌Lysate ELISAで高結合活性、配列の濃縮、等電点等を考慮し、⑤図中のクローン名が赤地のバインダーをピックアップし、大腸菌で発現精製した後、ELISAでEC50を測定した。検出はAnti-FLAG tag M2 HRP(1:20,000)を用いた。



合成ペプチド

同バインダーのN末に、中性に改変したFLAG-tag [DYKDNKDK:PI 6.93]をつけたペプチドを合成した後、それぞれの溶解性とEC50を測定した。検出はAnti-FLAG tag M2 HRP (1:2,000)を用いた。



各種溶媒への溶解性

name	hydrophilic	neutral	hydrophobic	PI	Solvent: Water	PBS(KCl)	DMSO	Formic acid
VRW-71	8	2	8	7.15	X	X	X	○
VRW-67	7	3	8	4.67	X	X	X	○
VRW-42	7	3	8	6.03	○	○	X	
VRW-80	6	4	8	5.20	X	X	○	
VRW-04	5	4	9	6.02	X	X	○	
VRW-59	2	8	8	2.84	X	X	○	
Original	3	4	11	4.30	X	X	○	

結果

PURE*frex* ELISA			E.coli Lysate ELISA			name		VRW	VRW	VRW	VRW	VRW	VRW					VRW		VRW					hydrophilic	neutral	hydrophobic	PI	EC50 [nM] MBP-fusion	EC50 [μM] 合成ペプチド
0.69	0.05	13.2	0.29	0.06	4.9	VRW-71	C	R	H	E	K	S	D	K	W	E	P	G	F	V	W	H	L	V	T	C	8	2	8	7.15	307.09	ND
0.81	0.03	24.8	1.71	0.07	24.8	VRW-67	C	E	V	E	S	S	D	R	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	4.67	328.71	ND
0.60	0.03	17.4	1.70	0.06	26.7	VRW-42	C	K	H	E	V	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	7	3	8	6.03	120.02	ND
0.96	0.06	15.5	1.79	0.07	25.7	VRW-80	C	H	V	E	S	S	D	Q	W	E	P	G	F	R	W	H	L	V	T	C	6	4	8	5.20	912.68	ND
0.69	0.03	27.0	2.66	0.27	9.9	VRW-04	C	H	V	E	S	S	R	N	W	E	P	G	F	L	W	H	L	V	T	C	5	4	9	6.02	200.01	ND
0.59	0.03	23.2	0.79	0.06	12.8	VRW-59	C	S	Y	E	S	S	N	L	W	E	P	G	W	T	W	Y	L	V	T	C	2	8	8	2.84	692.93	ND
						Original	C	E	V	V	L	S	R	L	W	E	P	G	W	S	W	Y	L	V	T	C	3	4	11	4.30	ND	56.71

・MBP-fusionペプチドはすべて、おおよそ数百nMレベルのEC50を示した。

・合成ペプチドはOriginal clone以外はわずかな結合活性を示し、合成ペプチドへの親水性アミノ酸の導入は結合活性を下げる結果となった。

・合成ペプチドの溶解性について、VRW-pool-67と71は酸性溶媒にしか溶解しない。特に、71は中性の等電点（PI=7.15)であるにも関わらず酸性溶媒でのみ溶解可能。

・中性の水溶性溶媒に溶解できるのはVRW-pool-42のみであった。

・その他VRW-pool-04, 59, 80は100%DMSOでのみ溶解できた。

まとめ

1，PURE*frex®RD*を使うことで、疎水性の高いペプチドに容易に網羅的な親水性アミノ酸の導入が可能。

2，PURE*frex®*は発現環境（酸化還元、シャペロン等）を最適化できるため、大腸菌よりもSS結合で環化した環状ペプチドの発現に有利。

3，疎水性ペプチドに親水性アミノ酸を導入する事で、Protein-fusion ペプチドとして発現させる場合には結合活性に有利に働くことが分かった。このことより、環状ペプチドを利用した融合タンパク、例えば既存の抗体をベースにしたBispecific antibodyの創作などへの応用に期待が持たれる。

4，逆に合成ペプチドとしての親水性アミノ酸の導入は、結合活性にマイナスに働く事が分かった。これは疎水性相互作用が下がったことによってペプチド自身の水溶液中での振動（揺らぎ）が増してしまい、結果として結合活性が下がってしまったものと考えられる。

5，ペプチドの親水性が上がる事で、水溶性溶媒への溶解が可能となった。しかしながらペプチド結合活性にはの等電点や溶媒のpH等を考慮する必要がある。

問い合わせ　E-mail: kojoh@genefrontier.com

URL:　www.genefrontier.com