

論文の内容の要旨

論文題目	<p>Construction of hybrid molecule libraries based on thioetherification of T7 phage-displayed peptides</p> <p>(和訳: T7ファージ提示ペプチドのチオエーテル化を基盤としたハイブリッド分子ライブラリーの作製)</p>
学位申請者	福永 圭佑

人工的な構造を持つペプチドが高いプロテアーゼ耐性、結合特異性、結合親和性、膜透過性を担保できるとして、近年、人工ペプチドライブラリーの作製が注目されている。特にM13ファージディスプレイ系で作製したペプチドライブラリーに化学修飾で有機化合物を共有結合させ、ハイブリッド分子ライブラリーを作製する手法が脚光を浴びている。しかしながら、大腸菌への感染能を損なわず、かつ選択的なファージ提示ペプチドの化学修飾を実現・証明した例は存在しない。そこで、T7ファージ提示ペプチドの化学修飾を行うことで、大腸菌への感染能を損なうことなく、意図した構造を持つハイブリッド分子ライブラリーが作製可能であること、さらにこれらライブラリーが任意の標的に結合するシードライブラリーとして有用であることを本研究で示す。

第1章では、ペプチドライブラリーの作製で用いられるM13ファージディスプレイ系とT7ファージディスプレイ系のそれぞれの長所・短所を総括した。

第2章では、システイン反応性の蛍光分子である tetramethylrhodamine iodoacetamide を用いて、M13ファージおよびT7ファージ提示ペプチドのチオエーテル化を行い、蛍光性ハイブリッド分子ライブラリーの作製を試みた。市販のM13ファージライブラリーを化学修飾したところ複数のM13ファージタンパク質が蛍光修飾され、M13ファージ提示ペプチド選択的な化学修飾は困難であることが明らかとなった。M13ファージに代えてT7ファージ提示ペプチドの化学修飾を試みたところ、予想外にも、gp10タンパク質に融合されたペプチドのみが蛍光修飾された。T7ファージ提示ペプチドではなく、gp10に含まれる内在性のシステインに蛍光分子が付加された可能性を排除するため、エンテロキナーゼを用いたT7ファージ提示ペプチドの特異的切り出しを行ったところ、蛍光性は完全に失われた。つまり、T7ファージ提示ペプチドのみが選択的に化学修飾されたことを示した。報告されているT7ファージキャプシドの構造解析から、gp10の内在性システインはT7ファージキャプシドの内側に位置するため、立体障害により修飾試薬が接触しにくいのであろうと考えられた。さらに、T7ファージ1粒子あたり200分子のペプチドを提示するモデルT7ファージを作製し、同様の化学修飾を行い、酵素消化後にLC-MS/MS解析を行った。これにより、T7ファージ提示ペプチド中のシステインのみがチオエーテル化されてい

ることを証明した。また、化学修飾したT7ファージライブラリーは大腸菌への感染能を失わないことを示した。つまり、T7ファージライブラリーを化学修飾することにより、極めて容易な方法でハイブリッド分子ライブラリーが作製可能であることを世界で初めて実証した。ここで作製した蛍光性ハイブリッド分子ライブラリーを用いて、モデルタンパク質であるGSTに結合する分子のセレクションを行ったところ、5回のセレクションで有意な結合が見られた。蛍光性分子を合成して、蛍光偏光法でGSTとの結合力を測定したところ、約3.4 μM の解離定数であることが判明した。

第3章では、サリチル酸のヨードアセトアミド誘導体を用いて、T7ファージ提示ペプチドのチオエーテル化を行いハイブリッド分子ライブラリーの作製を行った。サリチル酸はそれ自身が薬理活性を持つものであり、創薬ライブラリー作製におけるリード化合物として最適であると考えた。これにランダム化したペプチドを付加することで 10^9 程度の多様性を持つ、ハイブリッド分子ライブラリーの作製に成功した。次に、このライブラリーを用いてモデルタンパク質であるストレプトアビジンに結合するハイブリッド分子のセレクションを行った。4回のセレクションにより、ストレプトアビジンに対して有意な結合が観察された。ハイブリッド分子を合成して、蛍光偏光法でストレプトアビジンとの結合力を測定したところ、約180 nMの解離定数を持つことが明らかになった。

第4章では、システイン反応性のoligoethyleneglycol (OEG) リンカーを用いて、T7ファージ提示ペプチドの化学修飾を行い大環状ライブラリーの作製を行った。OEGは水溶性であり、免疫原性もないとされていることから高い生体適合性が期待できる。このライブラリーを用いて熱ショックタンパク質Hsp90に結合する大環状分子のセレクションを行った。Hsp90は分子シャペロンの一種であり、基質であるキナーゼ等との相互作用を通じてその機能発現を促進する。Hsp90の基質には細胞増殖に関与する分子が多く含まれ、がん治療における有望な分子標的であると考えられている。そこで、作製した大環状ライブラリーを用いてHsp90に結合する大環状分子のセレクションを行った。6回のセレクションによりHsp90への有意な結合が観察されたため、ペプチドの配列解析を行った。11クローンのうち10クローンは同一の配列を保持していた。Hsp90への結合部位を明らかにするため、Hsp90を3つのドメインに分割した組換えタンパク質を用いてGSTプルダウンアッセイを行ったところ、大環状分子はHsp90のN末端ドメインに特異的に結合することが明らかとなった。大環状分子を合成してHsp90 N末端ドメインとの結合親和性を調べたところ、解離定数は約1.7 μM であり、エンタルピーが相互作用に寄与していた。一方、OEGリンカーで環化しない直鎖状ペプチドはHsp90への結合が見られなかった。Hsp90のN末端にはATP結合ポケットが存在し、既存の低分子型Hsp90阻害剤はATP結合ポケットに結合するものが大半である。そこで、大環状分子がATP結合ポケットに結合するか競合蛍光偏光法で調べたところ結合が見られなかった。しかし、予想外にもHsp90の阻害薬であるゲルダナマイシンの結合を増強する効果を持つことを見出した。これはアロステリック効果によるものであると推察された。

本研究は、T7ファージ提示ペプチドのチオエーテル化を基盤として、多様性を持ったハイブリッド分子ライブラリーが作製可能であることを示した。さらに、異なる機能的・構造的な特徴を持つ3種類のライブラリーの作製に成功し、任意の標的に結合するハイブリッド分子を取得可能であることを実証した。既存のM13ファージライブラリーの化学修飾法ではなく、本研究で確立したT7ファージの化学修飾法がより複雑な構造をデザインしたハイブリッド分子ライブラリー作製に威力を発揮するであろう。

論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名 福永 圭佑

審査委員主査 瀧 真清

委員 丹羽 治樹

委員 石田 尚行

委員 平野 誉

委員 白川 英樹

平成26年1月28日に博士論文審査のための公聴会および最終試験を、5名の審査委員出席のもとで実施した。当日は学位申請者から40分で論文内容の発表を行って頂き、その後30分、研究内容について質疑応答を行った。

近年、人工的な構造を有するハイブリッド型人工ペプチドが創薬候補分子として期待されている。特に、ペプチドと遺伝情報が共役したライブラリーを化学修飾することでハイブリッド分子ライブラリーが作製され、薬剤探索への応用が進められている。本論文は、ハイブリッド分子ライブラリーを作製するための新規技術開発と薬剤候補分子取得への応用に関する研究である。

第1章では、本研究の重要な位置を占めるフェージディスプレイ法について、M13システムとT7システムを比較しながら概説している。

第2章では、ワンポットのシステイン還元・アルキル化反応により、T7フェージウィルス上に提示されたペプチドに任意の化合物を付加する新規の技術開発について報告している。ペプチドのチオエーテル化のため一般的な S_N2 反応を応用している。還元剤としてtris(2-carboxyethyl)phosphine、アルキル化剤として蛍光性のiodoacetamide誘導体を用いた4℃・水系溶媒中での反応により、副反応を生じることなくT7フェージ提示ペプチドの位置選択的なアルキル化反応が進行した。T7フェージの構造解析を例に、T7フェージが提示するペプチドは溶液に露出しており優先的にチオエーテル化反応が生ずる一方、ウィルスのキャプシド内部に位置する内在性のシステインは立体障害により反応しにくいのではないかと考察している。ウェスタンブロット解析から反応効率は少なくとも95%であると推察された。さらに、ランダム化されたペプチドを提示するT7フェージライブラリーに蛍光分子を付加し、蛍光性のライブラリーを作製している。蛍光分子を付加したT7ライブラリーは大腸菌感染力を損なわないことを報告しており、高品質のライブラリーが構築可能であると言及している。セクションによりGSTに結合する蛍光性分子の単離を行っている。

第3章では、アセチルサリチル酸を構造の一部に含む薬剤ライブラリーの作製を行っている。標的にはストレプトアビジンを選定し、セクションにより結合分子の濃縮・単離を行っている。蛍光偏光測定から取得された分子は解離定数180 nMでストレプトアビジンに対して特異的に結合することを示した。また、競合法

による蛍光偏光測定から薬剤様分子はストレプトアビジンのビオチン結合サイトに結合することを同定している。

第4章では、水溶性の高いオリゴエーテルを構造の一部に含む新規の環状分子ライブラリーの作製に成功している。トリプシンによる酵素消化とタンデム質量分析で詳細に環状分子の構造確認が行われている。本章では実際にがん治療における標的分子である熱ショックタンパク質Hsp90に結合する環状分子の単離を行っている。*in vitro*の結合アッセイより取得された環状分子がN末端ドメインに対してのみ結合することを明らかにした。等温滴定熱測定から環状分子は解離定数1.7 μM でHsp90に結合することを示した。この結合はエンタルピー駆動であり、オリゴエーテル構造が結合に関与している可能性が示唆されている。既存のHsp90阻害剤はHsp90のATP結合ポケットに結合してHsp90の機能を阻害するが、取得された環状分子はHsp90をアロステリック制御することにより、既存のHsp90 ATP結合阻害剤の親和性を高める効果を持つ。新しい作用機序を持つHsp90阻害剤の候補であることが言及されている。この一連の研究により、本技術が創薬候補分子を合成するための強力なツールであることが証明された。

結論では、本論文の総括と意義、今後の展望について述べている。

以上、本論文ではT7ファージが提示するペプチドのチオエーテル化反応により、多種のハイブリッド分子ライブラリーの合成に成功し、任意の標的タンパク質に結合する分子群を取得した。申請者が創成した創薬システムの技術は今後さらなる発展へとつながり得るものとして価値が高く、ケミカルバイオロジーに与えるインパクトは非常に大きい。よって、本論文は博士（工学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと認める。