

論文の内容の要旨

論文題目 Development of Novel Cyclization Strategies for Non-Standard Peptides Synthesized by Translation
(翻訳合成された特殊ペプチドの新規環状化戦略の開発)

氏名 佐古 佑介

天然に存在するペプチドには生理活性を有するものが数多く知られており、このようなペプチドのうち、多くのものは環状化構造をとっている。これは、環状化構造をとることで、ターゲットとの親和性が上昇すること、及びペプチダーゼなどの酵素による分解を防いでいるためであると考えられる。本研究では、リボソームによって合成されたペプチドを、ジスルフィド結合を用いないより安定な結合を介して環状化する方法の開発を目指した。この目的を達成するため、筆者は非天然アミノ酸を含むペプチド、いわゆる特殊ペプチドをリボソームにより合成し、新たに導入された官能基を用いてペプチドを環状化する戦略をとった。

第1章では、非天然アミノ酸のペプチドへの導入に重要な二つのテクノロジーについて概観した。第一のテクノロジーは、東大の上田、清水らのグループによって開発された再構成無細胞翻訳系である (PURE system)。PURE system の最大の特徴は、そのコンポーネントのうち任意のものを自由に取り除くことができることにある。そこで、系中から任意のアミノ酸を取り除くことにより、そのアミノ酸をコードするコドンに非天然アミノ酸に変換することができる。第二のテクノロジーは、筆者の所属する研究室で開発されたアミノアシル tRNA 合成を触媒するリボザイム、「フレキシザイム」である。フレキシザイムは、活性化されたアミノ酸の脱離基部分のみを認識するため、非天然アミノ酸でも効率よく tRNA に付加する。また、tRNA については3'末端側の配列 ACC-3'を認識し、その他の部分の配列に依らない。これらの技術を組み合わせることで、任意のアミノ酸を任意のコドンに割り当てることができ、特殊ペプチドの合成が極めて容易に達成されることを述べた。

第2章では、翻訳合成されたペプチドの環状化戦略の第一例として、クロロアセチル基をもつ非天然アミノ酸のペプチドへの導入を検討した。ペプチド中にシステイン残基が存在した場合、クロロアセチル基とチオール基での分子内反応が起こり、チオエーテル結合で環状化されたペプチドが得られることが期待された。そこで、まずクロロアセチル基を持つ非天然アミノ酸として N^γ-(2-chloroacetyl)-α,γ-diaminobutylic acid (Cab) を合成し、ペプチドへの導入を試みた。Cab はフレキシザイムにより効率よく tRNA にアミノアシル化されることが確かめられた。続いて、Cab のペプチドへの導入を PURE system を用いて試みた。MALDI-TOF MS による分析の結果、Cab を含むペプチドに対応する単一のピークが確認され、ペプチド中に Cab を導入できることがわかった。つぎに、ペプチド中に Cab と Cys を同時に導入したところ、期待通りチオエーテル結合で環状化した単一のピークがみられた。このことから、ペプチドの環状化反応が翻訳反応溶液中で、定量的かつ自発的に進行することが確かめられた。つぎに筆者は、天然に存在する生理活性ペプチド human urotensin II (hU-II) のジスルフィド結合を、Cab を用いたチオエーテル結合に置き換えることを試みた。細胞内カルシウム動員を指標にした生理活性評価をおこなった結果、teU は hU-II 様の活性を持つことが明らかになった。一方で還元条件下における proteinase K に対する耐性は劇的に上昇して

いることが示された。このような特徴は、血中のような生理的環境化において高い安定性を求められる薬理ペプチドを開発する上で、極めて重要であると考えられる。

第3章では、翻訳合成されたペプチドの環状化戦略の二例目として、銅触媒によるアジドとアルキンの付加環化反応を用いることを検討した。クリックケミストリーとも呼ばれるこの反応は、水中で定量的に進行し、生体分子に影響されずに用いることができることから様々な分野での応用が期待されている。そこで、アジド基を側鎖に含む非天然アミノ酸として、azidohomoalanine (Aha), azidonorvaline (Anv), azidonorleucine (Anl) を、またアルキンを側鎖にもつ非天然アミノ酸として、propargylglycine (Pgl) を用意し、これらを PURE system を用いてペプチド中に導入することで、環状ペプチドを合成できるのではないかと考えた。Aha, Anv, Anl, 及び Pgl を活性化し、フレキシザイムによるアミノアシル化効率を microhelix を用いて評価したところ、いずれも 50%前後の収率で反応が進行することが確かめられた。そこで、各々のアミノ酸のペプチドへの導入を PURE system により試みた。まず、PURE system から Thr を抜いた系に、Pgl でアミノアシル化された tRNA を導入すると、Pgl を含むペプチドが合成された。同様に、Leu を抜いた PURE system では Aha, Anv, Anl ともに導入することができた。そこで、Thr 及び Leu を抜いた PURE system を用いて、アジドとアルキンを同時にペプチドに導入したところ、アジド基の鎖長によらず翻訳合成が進行することが確認された。アジドとアルキンを含むペプチドを翻訳反応により合成することができたので、これらの官能基をクリックケミストリーを用いて反応させることにより、環状化ペプチドの合成を試みた。Pgl 及び Anl を含むペプチドを翻訳合成したのちに TCEP を用いて処理すると、アジド基が完全に還元されたピークが見られた。次に、アジドとアルキンの付加環化反応を起こすため、翻訳合成されたペプチドを CuSO₄ 及び ascorbate で処理し、そののちに TCEP を加えた。その結果、ペプチドの還元はおこらず、系中のアジド基が定量的に環状化反応に使われたことが確認された。また、同様の結果は Aha, Anv を用いたときにも得られた。以上の結果から、クリックケミストリーを用いることで、翻訳合成されたペプチドを定量的に環状化できることが示された。本論文ではさらに、Cab-Cys によるチオエーテル結合と、アジド-アルキン付加環化反応を組み合わせることにより、より安定な構造を持つ二環ペプチドの合成を試みた。Leu, Thr, Phe のアミノ酸を取り除いた PURE system を用いて3種類の非天然アミノ酸、Cab, Aha, Pgl の導入を試みた。翻訳反応後、ペプチドを CuSO₄ 及び ascorbate で反応させたのち、アジド-アルキン付加環化反応が進行していることを確認するため、TCEP で処理した。その結果、還元されたピークは見え、期待通り二環構造を取っているピークのみが観測された。また、同様の二環ペプチドは、Anv, Anl を用いたときにも合成されることが分かった。

第4章では、tRNA を用いたフレームシフト変異の抑制を利用した遺伝病の新規治療法について述べられている。

第5章では、本論文の総括と展望を述べている。

本研究では、フレキシザイムと PURE system を組み合わせることで、種々の官能基を持った非天然アミノ酸を翻訳合成によりペプチド中に導入することができた。また、これらの官能基を分子内で反応させることで環状化ペプチドを合成することに成功した。前半で示した Cab-Cys の反応により形成されるチオエーテル結合や、後半で紹介したアジドとアルキンの付加環化反応による側鎖どうしの結合は、還元条件下で容易に開裂してしまうジスルフィド結合に比べ、きわめて高い安定性をもつことが特徴である。したがって、本手法を用いて合成された環状ペプチドは血中などの生理的条件下においても高いプロテアーゼ耐性をもつことが期待され、薬剤開発へ向けた応用が期待される。