

審査の結果の要旨

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。このような特徴から、環状ペプチドは新規薬剤開発のプラットフォームとして優れており、新たな創薬シーズの探索が積極的におこなわれている。本論文では、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について述べている。

第1章では、非天然アミノ酸をペプチドへ導入するために必要な二つのテクノロジーについて概観している。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、**PURE system** である。**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为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、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、天然・非天然を問わず様々なアミノ酸を迅速かつ簡便に、tRNA に付加することができる。そこで、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が述べられている。

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ている。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る。そこで、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、ペプチドへ導入できるかどうかを検討したところ、効率よくペプチド中に取り込まれていることを電気泳動、及び質量分析の結果から明らかにしている。特に、質量分析の結果から、**Cab** のクロロアセチル基は反応系中の **DTT** などとは反応せず、安定に存在できることが明らかにされている。更に、ペプチド中に **Cab** とシステインを同時に導入した場合、分子内反応によるチオエーテル結合の形成により定量的に環状化ペプチドを得ることに成功している。この反応は、翻訳系中にお

いて自発的に進行することから、簡便な環状化ペプチドの合成法として意義深い。次に本研究で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ている。翻訳合成されたペプチドは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こす一方、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明らかにされている。以上の結果より、**Cab** の導入によって環化されたペプチドは、血中で高い安定性を要求される薬剤ペプチドのプラットフォームとして有効だろうと考察している。

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ている。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、及びアルキンを側鎖にもつ非天然アミノ酸を用意し、これらを **PURE system** を用いてペプチド中に導入することで、環状ペプチドの合成を試みている。電気泳動、質量分析の結果から、これらのアミノ酸が同時に導入されたペプチドが **PURE system** により翻訳合成されていることが確かめられている。さらに、銅を用いた付加環化反応についても、定量的に進行したことを確認している。本論文ではさらに、第2章で開発された **Cab** とシステインによるチオエーテル結合と、第3章で開発されたクリックケミストリーによる環化反応を組み合わせることで、二環ペプチドを位置選択的に合成することができると述べられている。まず、**Cab**、アジド基含有アミノ酸、及びアルキン含有アミノ酸の3種類の非天然アミノ酸をペプチド中に導入することに成功している。次いで、チオエーテル基の自発的な形成の後、銅触媒を用いた付加環化反応を行うことで、期待通り二環ペプチドの合成を達成している。このような構造をもったペプチドは、単環のペプチドに比べて、より剛健な構造をもったプラットフォームとして活用されるであろうと述べられている。

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。

以上、本論文では、非天然アミノ酸をペプチド中に導入することで、ジスルフィド結合に代わる、高い安定性を持った結合による環状ペプチドの翻訳合成法が提案されている。これらの方法は、**mRNA** ディスプレー等の手法を用いた **in vitro selection** をする上での基盤技術となることが期待され、今後積極的に行われるであろう薬剤ペプチドの探索に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。