

論文の内容の要旨

論文題目 **Methods for the ribosomal synthesis of non-standard cyclic peptides and their libraries and the discovery of cyclic N-methyl peptide inhibitors of ubiquitin ligase E6AP toward an anti-cervical cancer drug**

(特殊環状ペプチドおよびそのライブラリーの翻訳合成法と子宮頸癌治療薬をめざしたユビキチンリガーゼE6APに対する環状N-メチルペプチド阻害剤の探索)

氏 名 山 岸 祐 介

序論

現在の医薬品は、低分子化合物および抗体を原薬とするものが主流であるが、両者の利点を併せ持つ分子として特殊ペプチドが注目されている。特殊ペプチドとは、サイクロスポリン A 等のように天然型アミノ酸とは異なる、N-メチルアミノ酸、D-アミノ酸といった特殊アミノ酸や大環状構造などの独特な化学構造を持つペプチド群の総称である。これらの特殊構造がプロテアーゼ耐性や結合親和性、結合特異性、膜透過性、腸管吸収性を改善するため、特殊ペプチドは新しい創薬候補分子として期待されている。しかし、高い多様性をもつライブラリーの構築や効率的なスクリーニングは、既存の技術では難しい。

近年、我々や他の研究グループは、分子生物学やタンパク質工学、核酸化学、有機化学を融合させ、特殊な翻訳系を構築し、遺伝暗号をリプログラミングすることで、複数の特殊アミノ酸を含む特殊ペプチドを合成できることを報告している。特に我々のグループは、フレキシザイムと呼ばれるアミノアシル tRNA 合成リボザイムを利用した **Flexible *In vitro* Translation (FIT)** システムを用いて、これまで大環状骨格やポリエステル、N-メチルペプチド等の複雑な特殊ペプチドを合成に成功してきた。しかし、薬剤およびバイオプローブの探索を視野に入れると、新規の特殊ペプチドを翻訳合成する基礎技術の開発は重要である。また FIT システムと *in vitro display* 法を融合した高速スクリーニングシステムである **RaPID(Random Peptide Integrated Discovery)** システムを利用した、生理活性を有する特殊ペプチドを単離した事例は少ない。特に複数種の特殊アミノ酸が導入されたペプチドの探索は未だ達成されていない。そこで、本研究では FIT システムに対応する酸化的カップリング反応を用いた新規環状ペプチド翻訳合成法の開発を目指した。そして、次に RaPID システムを用いることで、環状 N-メチルペプチドライブラリーからのユビキチンリガーゼ E6AP の阻害剤探索をおこなった。

蛍光発生型酸化的カップリング反応を用いた環状ペプチド翻訳合成法の開発

環状ペプチドは、上述したように、プロテアーゼ耐性や標的への高い親和性が期待できることから、薬剤およびバイオプローブとしての利点を数多く持っている。しかし、一般的に利用される分子内ジスルフィド結合による環状化方法は、細胞内の還元条件下で切断され、ペプチドが速やかに分解される欠点がある。一方、架橋剤を利用したペプチド環化法が利用されているが、ランダム領域に現れるアミノ酸側鎖と反応し、ペプチドの構造決定が困難になる恐れがある。そこで、位置選択的に安定な構造を与える方法論が必要である。本研究では水中で進行する酸化的カップリング反応を利用し、安定な環化構造を与え、同時に蛍光特性を与える新規ペプチド環状化法の開発を行った。

5-ヒドロキシインドールとベンジルアミンは酸化剤 $K_3Fe(CN)_6$ 存在下、室温、水中でカップリング反応し、蛍光団としてベンゾオキサゾール誘導体を形成することが報告されている。本反応は、生体試料中の微量な 5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)を定量するために開発された手法であり、夾雑物に影響されず定量的な反応を示す。これらの報告より、5-ヒドロキシインドールおよびベンジルアミン骨格を有する非タンパク質性アミノ酸を FIT システムによってペプチドに導入後、直接酸化剤を添加することでペプチドを迅速かつ定量的に環化し、蛍光特性を付与できると考えた。

最初に、カップリング反応に必要な官能基を有する特殊アミノ酸(^{bza}F および W^{OH})を調製した(図 1)。これらのアミノ酸を FIT システムにより、ペプチド N 末端に ^{bza}F を、C 末端側に W^{OH} を導入した。続いて、このペプチドに対して $K_3Fe(CN)_6$ を加え、ペプチド環化反応を行った。質量分析の結果、スペクトル上には環状ペプチドの質量数と一致するピークのみを観測できたため、分子内環化反応は収率良く進行することが示唆された。次に、ペプチドの蛍光測定を行った結果、基質である直鎖ペプチドは、ほとんど蛍光を示さないが、カップリング反応後の環化ペプチドは、蛍光団単体に類似した蛍光特性を示した。また、鎖長の異なるペプチドにおいても同様の結果を得た。これらの結果より、酸化的カップリング反応を用いた、蛍光性環状ペプチドの翻訳合成が可能であることを証明した。

本研究で開発したペプチド環状化法は、ランダム DNA から蛍光性環状ペプチドライブラリーを構築することができる。そして、*in vitro display* 法を組み合わせることで、タンパク質や核酸等の標的分子に結合する蛍光プローブの探索へ応用できると期待している。

子宮頸癌治療薬をめざしたユビキチンリガーゼ E6AP に対する環状 N-メチルペプチド阻害剤の探索

天然由来の特殊ペプチド中には、ペプチド主鎖上に複数の N-メチル化が確認される。この構造は、プロテアーゼ耐性や標的への親和性、選択性を向上させるが、特に膜透過性が期待できるため、細胞内の標的にアプローチできる可能性を有している。そのため、N-メチルペプチドは新たな創薬シーズと位置づけられ、翻訳系による合成が試みられてきた。しかし、N-メチルアミノ酸のペプチドへの導入効率の低さや異なるアミノ酸の取り込みの

ため、ライブラリー化するための実用的な方法が存在しなかった。我々のグループの川上らは FIT システムを用いて N-メチルアミノ酸の導入を試み、複数の N-メチルアミノ酸が高い効率で導入できることを報告してきた。また特殊アミノ酸である N 末端のクロロアセチル基とシステイン側鎖のスルフィドリル基間の自発的チオエーテル環状化法を利用して、環状 N-メチルペプチドの翻訳合成に成功した。しかし、ランダムペプチドライブラリーの構築および RaPID システムによる薬剤探索は行われていなかった。そこで、本研究では環状 N-メチルペプチドライブラリーを利用し、生理活性ペプチドの探索を行った。標的として、子宮頸癌に関与するヒト由来のユビキチンリガーゼ E6AP を選んだ。E6AP は、ヒトパピローマウイルス由来のタンパク質 E6 と相互作用することで、p53 の過剰な分解を引き起こし、細胞を癌化させる。したがって、E6AP の阻害により、p53 によるアポトーシスが誘導され子宮頸癌の治療が可能であると考えられている。本研究では、未だ阻害剤が存在しない E6AP を標的に環状 N-メチルペプチド阻害剤の探索を行った。

環状 N-メチルペプチドライブラリーを構築するため、ランダム領域に NNU コドンを繰り返した配列を持つ mRNA ライブラリーを調製した。FIT システムにおいて、ペプチドへの高い導入効率を示す N-メチルフェニルアラニン(^{Mc}F)、N-メチルセリン(^{Mc}S)、N-メチルグリシン(^{Mc}G)、および N-メチルアラニン(^{Mc}A)をそれぞれ 4 つのコドンに割り当てた。一方、チオエーテル環化法を用いるため、開始コドン(AUG)にクロロアセチル-D-トリプトファンを、ランダム配列の下流にシステインのコドン(UGC)を配置した。各々の特殊アミノ酸は、フレキシザイムを用いることで対応する tRNA に連結し、必要最低限の天然アミノ酸とアミノアシル tRNA 合成酵素、およびピューロマイシンリンカーを連結した mRNA ライブラリーを含む FIT システムで翻訳反応を実行した。環状 N-メチルペプチドを提示した mRNA の cDNA を合成後、標的タンパク質であるビオチン化 E6AP Hect ドメインと混合した。その後、ストレプトアビジン磁性担体で標的とペプチドアダプターを分離し、cDNA を回収、DNA 増幅をおこなった。以上の操作を繰り返すことで、RaPID システムによる環状 N-メチルペプチドのスクリーニングを実行した(図 2)。その結果、6 ラウンド後に cDNA 回収率の増加が観察されたため、配列解析を行った。得られたペプチド配列は収束しており、N-メチルアミノ酸の導入が 3 もしくは 4 カ所見られた。各々の cDNA を利用し、これらの環状 N-メチルペプチドが正確に翻訳合成されることを質量分析によって確認した。この結果より、RaPID システムを用いた、環状 N-メチルペプチドの単離を証明することができた。

次に単離された環状 N-メチルペプチドを Fmoc 固相合成法により調製し、表面プラズモン共鳴法によって E6AP Hect ドメインに対する結合解析を行った。その結果、このペプチドは、E6AP Hect に対して非常に高い親和性($K_d < 1 \text{ nM}$)を示した。また強固な結合には、環状構造および N-メチル基が必須であることを確認した。さらに、ペプチドが E6AP のユビキチンリガーゼ阻害活性を有していることを確認した。

本研究では、環状 N-メチルペプチドライブラリーを用いて、標的に結合する環状 N-メチルペプチドの単離に世界で初めて成功し、RaPID システムが機能することを証明した。また、

得られたリガンドは標的に非常に強く結合し、阻害剤として機能することを示した。本技術を用いて、任意の標的に対する環状 N-メチルペプチドの探索が実施できると考えられる。

結論

本研究では、新規ペプチド環状化方法を開発することで、FIT システムによるペプチド翻訳合成の基礎技術を拡張した。この環状化法を利用することで、ペプチドにベンゾオキサゾール型のヘテロ環構造を導入し、蛍光特性を与え、新しいライブラリーの構築が可能になった。また RaPID システムを利用することで、環状 N-メチルペプチドライブラリーから生理活性ペプチドの創出に成功した。特にランダム領域に複数の特殊アミノ酸が導入された特殊ペプチドの単離は、全く初めての結果であった。この結果は、さらに高度な特殊ペプチドの探索を大きく推進する実証例となった。本論文で開発した技術は、特殊ペプチドを基盤とした薬剤やバイオプローブ探索を強力に押し進めることが可能であり、ケミカルバイオロジーの発展に寄与できるものと信じている。

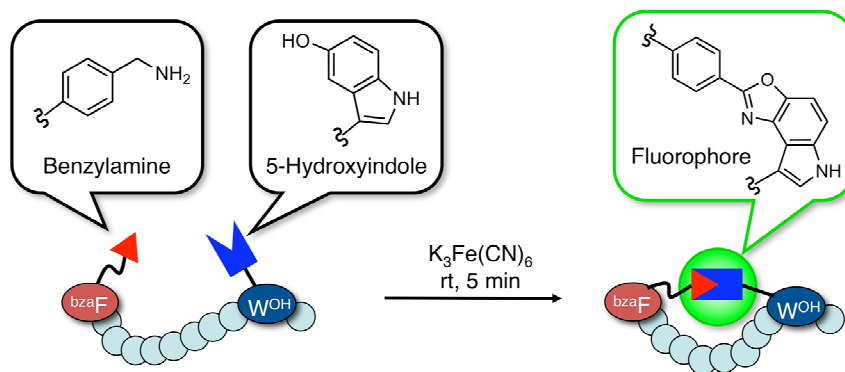


図 1 酸化的カップリング反応を用いた新規ペプチド環状化法

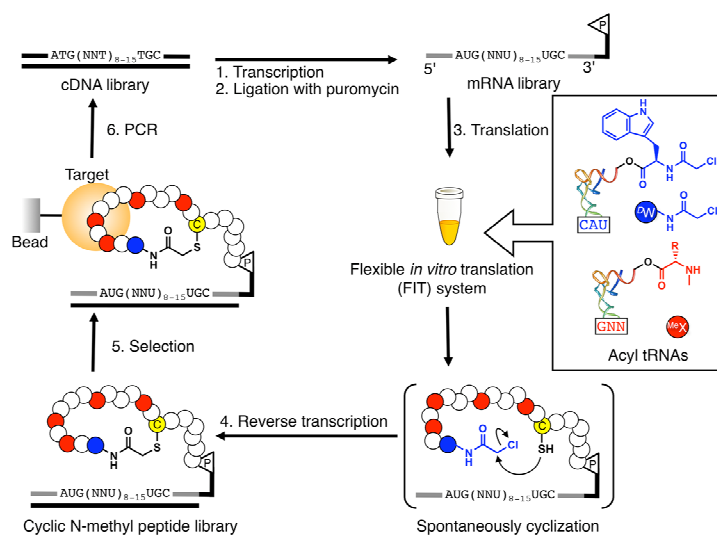


図 2 RaPID システムを用いた環状 N-メチルペプチドの探索