

## 審査の結果の要旨

氏名 山岸 祐介

近年、シクロスポリン A のような大環状骨格や N-メチルアミノ酸を有する特殊ペプチドと呼ばれる分子群が創薬候補分子として期待されている。既存の技術では、特殊ペプチドの合成および探索が十分になされているとは言いがたい。一方、リボソームによる翻訳合成系は、本来 20 種類のタンパク質性アミノ酸からなるペプチドを産生するが、翻訳系を人工的に改変することで N-メチルアミノ酸、D-アミノ酸といった特殊アミノ酸が導入できることがわかってきた。改変した翻訳系を用いることで、特殊ペプチドを合成する技術が発展し、薬剤探索への応用が期待されている。本論文は、改変した翻訳系の応用についての記述である。

第 1 章の序論では、特殊ペプチドの定義と重要性、及び特殊ペプチドに見られる環状構造や特殊アミノ酸が如何に生理活性に寄与するかを説明している。そして従来の特特殊ペプチドの合成方法と薬剤探索方法を挙げながら、それらの問題点を挙げた。その次に改変した翻訳系において、特殊ペプチドの合成を可能にする技術背景と *in vitro* ディスプレイ法を用いた薬剤探索への展開へ応用できることについて言及している。さらに、これまでの特殊ペプチド合成例について説明し、環状ペプチドの翻訳合成が十分に達成されておらず、解決すべき問題であることを指摘した。また改変した翻訳系と *in vitro* ディスプレイ法を利用することで、特殊環状ペプチドライブラリーから活性種の単離が迅速に達成できることについて言及し、これまで複数種の特特殊アミノ酸を含む大環状ペプチド探索が達成されていないことを指摘している。

第 2 章では、特殊ペプチドとして重要な構造である大環状構造を翻訳系で作りに出す新規技術開発を報告している。共有結合形成反応としてベンジルアミンと 5-ヒドロキシインドールの蛍光発生型酸化的カップリング反応を応用している。特殊アミノ酸としてベンジルアミンのフェニルアラニン誘導体と 5-ヒドロキシトリプトファンを同時にペプチド内に導入後、酸化剤を作用させることで温和な条件下で迅速にペプチドの環状化反応が進行した。さらに蛍光を発生することから、目的のヘテロ環結合の形成を確認している。またペプチドの残基

数が 5-11 と変化しても環状化反応が進行し、環化体が蛍光を示すことを報告している。この手法は、温和な条件で迅速に、2つの特殊アミノ酸間で位置選択的な反応を与えるペプチド環状化法として新規性が高い。他の直交性を示す反応と組み合わせることで、剛直性の高い二環性のペプチドが調製できると考えられる。

第3章では、改変した翻訳系と *in vitro* ディスプレイ法を利用して、これまでに報告されていない新規の環状 N-メチルペプチドライブラリーを構築し、その中から活性種の単離に成功した。ライブラリー構築の際には、ライブラリーデザインおよび翻訳合成量の最適化を行なうことで、高い多様性を確保した。次にユビキチンリガーゼ E6AP HECT ドメインに対して結合する環状 N-メチルペプチドを単離した。このような *in vitro* ディスプレイ法で環状 N-メチルペプチドが得られた報告例は存在しない。次に単離された環状 N-メチルペプチドは、E6AP HECT ドメインに対して強固に結合する(解離定数=0.6 nM)ことを確認した。さらに、それらの活性種が *in vitro* で E6AP を阻害することを報告している。また標的への結合及び *in vitro* での E6AP 阻害活性はペプチド中の環化構造及び N-メチル基構造に依存することを明らかにした。この一連の研究により、本技術が創薬候補分子として期待されている環状 N-メチルペプチドの探索技術として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、本論文では改変した翻訳系を応用することで、特殊構造を有するペプチドの合成を達成した。ヘテロ環または N-メチル基を持つ環状ペプチドは、高い剛直性から標的への親和性やプロテアーゼ耐性に優れるなどの薬剤らしい特性を有していると考えられる。これらの成果が、今後のバイオテクノロジー及びケミカルバイオロジーの発展に与える意義は非常に大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格であると認められる。