

## 論文の内容の要旨

論文題目 脂肪鎖及び $\gamma$ アミノ酸含有特殊ペプチドの翻訳合成

氏名 大城 幸紀

従来、医薬品として用いられている化合物や開発されている化合物の多くは有機合成的手法によって作られる小分子化合物が主流である。しかし、小分子化合物は経口投与が可能で細胞膜透過性も高い等の利点を有しておりながらも、ターゲットに対する選択性という観点では低く、その為副作用を併発してしまう可能性も持っている。

近年、ペプチドや抗体を用いた創薬が行われるようになってきた。中でもペプチドは、抗体同様、高い特異性を持ち、分子量が比較的小さいため組織浸透性が良い点も有し、新たな創薬シーズとしても期待されている。しかし、ペプチドは生体内でプロテアーゼ等の分解酵素により容易に分解されてしまい経口投与できないという点、細胞膜透過性が悪いという点等の欠点も併せ持つ。

しかし、免疫抑制剤シクロスポリン A 等、多くの天然から得られたペプチド製剤が存在して利用されており、これらのペプチドは、20 種類のタンパク質性アミノ酸以外の特殊アミノ酸を含有し、その為に薬理作用を持ち、生体内安定性や細胞膜透過性をも獲得しているものと考えられる。特殊骨格の例として、N 末端脂肪鎖修飾、D-アミノ酸、 $\beta$ 、 $\gamma$ アミノ酸、大環状化構造等多岐にわたる。一方、天然のタンパク質は通常リボソームにより合成されるが、20 種類のタンパク質性アミノ酸のみによって合成される。しかしリボソームでは特殊アミノ酸を含有するペプチドは合成する事はできず、天然では NRPS(Non Ribosomal Peptide Synthetase)と呼ばれる巨大なタンパク質複合体によって合成される。しかしながら NRPS を用いた特殊ペプチドの合成を利用するには、このたんぱく質に変異を導入するなどして基質許容性を高める必要があり、特殊ペプチドを網羅的に合成する事は非常に時間とコストがかかると考えられる。一方で、2001 年に報告された、再構成試験管内リボソーム翻訳系は、反応の迅速性や、正確性、および DNA の配列をランダム化する事でペプチドのライブラリー化が容易であるという長所を持つ。そして、幾つかの構成要素に関して言えば (例えば、RF1 やアミノ酸等)、一部の要素をあらかじめ添加せずに用いる事が出来るという大きな特徴も有する。この長所を生かし、特殊アミノ酸含有ペプチドの合成が可能となり、これにより特殊ペプチドの研究が広く行われている。すなわち、tRNA に特殊アミノ酸を人工的にアミノアシル化し、翻訳系中で終止コドン等の空きコドン、若しくはあらかじめ 20 種類のアミノ酸のうち幾つかを除き、空きコドンを作成し、これら空きコドンに特殊アミノアシル tRNA を対応させて翻訳合成するものである。しかし多くのグループは、アミノアシル化の段階で導入可能な特殊アミノ酸に制限がある事が課題とな

っている。

申請者が所属する研究室では、フレキシザイム (Fx) と呼ばれる、任意のアミノ酸 (Xaa) を任意の tRNA 上へアミノアシル化できる画期的な人工 RNA 触媒を開発し、2006 年に報告した。そして再構成 *in vitro* 翻訳系において不要なアミノ酸を翻訳系中

から除き、空きコドンを作りそこへ特殊アミノ酸を新たに対応付けるという「遺伝暗号リプログラミング」により、N メチルペプチドやポリエステル結合を有するペプチド等、特殊アミノ酸含有ペプチドを翻訳系で合成してきた。(図 1)

さらに当研究室において特殊ペプチドライブラリーを構築し、mRNA ディスプレイという技術により、標的タンパク質に特異的結合能を示す特殊ペプチドの取得も一部達成している。しかしライブラリーの多様性を考えると、現在用いる事が出来る特殊アミノ酸は限られており、新たなビルディングブロックの開発が求められている。その中で申請者は Fx を用いて、創薬上有益な細胞膜透過性を付与できる可能性のある、脂肪鎖修飾を受けたペプチド (二章)、およびペプチドの安定性に寄与すると思われる  $\gamma$  アミノ酸を含有するペプチドの翻訳合成を目的とし研究を行った (三章)。

第二章では、N 末端に脂肪鎖修飾を有するペプチドの翻訳合成の検討について述べる。

天然にはダプトマイシンのような、N 末端が脂肪鎖により修飾された薬理活性ペプチドが多数存在し利用されている。その脂肪鎖によって細胞膜に作用していると考えられる。また、これら脂肪鎖修飾ペプチドを翻訳系で合成した例はこれまで無い。これにより、申請者の所属する研究室において、全く新しいビルディングブロックを持つ特殊アミノ酸ライブラリーを構築することが出来る。さらにその中から、スクリーニングによって、生理活性を有するペプチドの取得やペプチドの膜透過、または膜局在化等の機能を付与できる可能性がある。

実験では、Fx を用い、始めは脂肪鎖を持つアミノ酸の直接アミノアシル化を試みた。しかし、実験を重ね検討した結果、脂溶性が高く反応が進行しないことが判明した。そこで、あらかじめ Fx により天然型フェニルアラニン tRNA 上に結合し、その後、slufo-NHS によって活性された脂肪酸をフェニルアラニル tRNA と反応させるという、二段階アミノアシル化法を考案し、アミノアシル tRNA を得る事に成功した。(図 2) この脂肪鎖修飾アシル tRNA を用い、メチオニンを除いた翻訳系中で翻訳反応させ、脂肪鎖修飾ペプチドが翻訳できた

	U	C	A	G	
U	Phe Leu	Ser	Tyr STOP	Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu	Pro	His Gln	Xaa <sup>2</sup>	U C A G
A	Xaa <sup>3</sup> Met	Thr	Asn Xaa <sup>4</sup>	Ser Arg	U C A G
G	Xaa <sup>1</sup>	Ala	Asp Glu	Gly	U C A G

図 1 遺伝暗号のリプログラミング

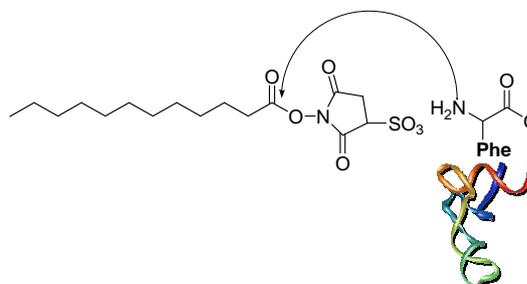


図 2 アミノ酸の  $N^{\alpha}$ -アシル化

事が MALDI-TOF-MS で確認された。脂肪鎖の鎖長を C10、C12、C14 と、種々変えても導入できた。さらに側鎖に反応性の高いチオールやアミノ基を有する Cys、Lys 以外の 18 アミノ酸を用い、炭素数が C12 である脂質を用いても脂肪鎖修飾ペプチドの翻訳合成を達成した。この研究で考案した二段階アミノアシル化法は他の脂溶性基質を付与する際のツールともなる。

本研究の将来性としては、脂肪鎖を含み、ランダム配列を持つペプチドライブラリーを構築し、mRNA ディスプレイ等の技術と組み合わせて細胞膜透過性能を持つ薬理活性特殊ペプチドの取得が期待される。

第三章では、薬理上有用で、ペプチドの安定化に寄与すると思われる  $\gamma$  アミノ酸含有ペプチドの翻訳合成の検討について述べる。

天然には Pepstatin、Bidemnin B など、 $\gamma$  アミノ酸含有ペプチドが存在し、それぞれ、pepsin、HIV protease などの酸性プロテアーゼ阻害、抗ガン活性を有し、極めて重要な薬理活性を有している。Pepstatin は 5 つのアミノ酸と短い脂肪鎖によって構成されたペプチドである。この中に含まれる  $\gamma$  アミノ酸である Statine 残基が、プロテアーゼの活性部位に入り込み阻害する機構が知られていることから、 $\gamma$  アミノ酸を含有させることによって、

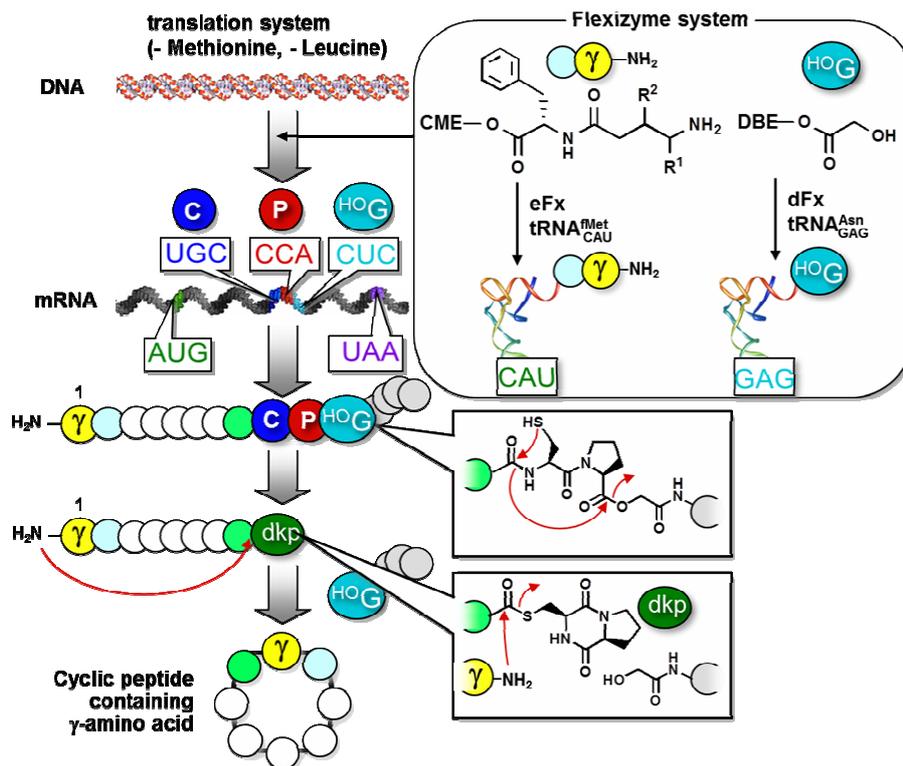


図3  $\gamma$  アミノ酸含有ペプチドの one pot 主鎖環状化戦略: Cys-Pro-<sup>HO</sup>Gly の連続配列によりジケトピペラジンチオエステル体が中間体として得られ、次いで N 末端アミノ基の求核攻撃によって環化される。

ペプチドの生体内安定化に寄与すると考えられる。私はこの $\gamma$ アミノ酸に着目し、 $\gamma$ アミノ酸含有ペプチドの翻訳合成を目指した。しかし実験の結果、 $\gamma$ アミノアシル tRNA は翻訳系中で分子内求核攻撃を起こしアシル tRNA が分解しラクタムと tRNA が生成する事が判明したため、フェニルアラニンとのジペプチド体として Fx によりアミノアシル化し、翻訳系に用いた。6 種類の $\gamma$ アミノ酸のジペプチド体を用いてアミノアシル化し、翻訳した所、全ての基質について MALDI-TOF-MS によりペプチドへの導入が確認された。

さらに、 $\gamma$ アミノ酸をペプチド鎖中に導入する事を目的として、 $\gamma$ アミノ酸含有主鎖環状ペプチドを合成する事を試みた。Pepstatin の例では、含有されている二つの Statine のうち、C 末端によるものではなく、ペプチドの中心部に含有されている Statine がペプチダーゼ阻害活性を有している事が分かっている。そこで、申請者は、ジペプチド体を伸長反応では導入できない為、主鎖環状する事でペプチド鎖中に導入する事を考案した。方法論としては、ペプチドの C 末端側に Cys-Pro-HO<sup>+</sup>Gly (グリコール酸) 配列を Fx により構築する事を考案した。これは、システインのチオール基による求核攻撃と Pro-HO<sup>+</sup>Gly 間のエステル結合の切断をドライビングフォースとした分子内反応が誘起され、中間体としてジケトピペラジンチオエステル体が得られる。この中間体は反応性がエステル結合やアミド結合より高く、N 末端のアミノ基と反応して主鎖環化反応を起こし、主鎖環状ペプチドが得られるのではないかと考えた。この方法により、加水分解物等も確認されたが、one pot で $\gamma$ アミノ酸含有主鎖環状ペプチドを得ることに成功した。(図 3) 今後の展望として、ペプチドの安定性に寄与する $\gamma$ アミノ酸含有ペプチドをライブラリー化し、mRNA ディスプレイ等の技術を合わせ、薬理活性ペプチドの取得を目指す。