

## 審査の結果の要旨

氏名 大城幸紀

大城幸紀氏は、試験管内翻訳系を用いて薬理活性ペプチドの取得およびその為のペプチドのライブラリー化の為の基盤技術の構築を目指し、新しい基質として脂肪鎖含有アミノ酸及び、 $\gamma$ アミノ酸を用いて、初めてこれらを特殊骨格として含有するペプチド、すなわち特殊ペプチドの翻訳合成技術に関して研究を行った。

第一章では、ペプチド薬剤開発において、既存の、天然から抽出されて利用されてきた薬理ペプチドが持つ化学的構造の重要性、そして特殊アミノ酸および特殊骨格の重要性、特殊ペプチドを翻訳系により合成する為に必要なアミノアシル tRNA の合成法、これを用いた遺伝暗号の改変による特殊ペプチド合成の方法論、既存の特殊ペプチドライブラリー化技術及び、特殊ペプチドライブラリーのスクリーニング法について述べられている。

第二章では、申請者が新たに開発した二段階アミノアシル化法によって、脂肪鎖の脂溶性の高さゆえに従来達成不可能であった、特殊ペプチド合成に必要な脂肪鎖含有アミノアシル tRNA を取得する事に成功し、この技術と遺伝暗号の改変技術を用いることで、その N 末端に脂肪鎖を含有するペプチドの翻訳合成を達成したものである。脂肪鎖としては炭素数が 10 であるデカン酸、炭素数 12 であるドデカン酸、さらに炭素数 14 であるテトラデカン酸の 3 種類の長さを持つものについて達成している。さらにその二段階アミノアシル化法を多様なアミノ酸を用いて行う事でその方法論の汎用性について示し、そしてもう一つの特殊アミノ酸である  $N^{\gamma}$ クロロアセチル  $\alpha, \gamma$ ジアミノブチル酸を同時にペプチド鎖中に導入する事によって非天然型環状構造を有する脂肪鎖含有特殊環状ペプチドの翻訳合成についても達成したものである。この方法を用いる事で今後は脂肪鎖含有特殊環状ペプチドライブラリーの構築、及び第一章で述べた mRNA ディスプレイ法によるスクリーニングを行い、標的タンパク質に特異的に作用する脂肪鎖含有特殊環状ペプチドの取得が期待される。

第三章では、同様に遺伝暗号の改変技術によってタンパク質性アミノ酸である  $\alpha$ アミノ酸よりも炭素骨格が二つ長い、 $\gamma$ アミノ酸を N 末端に含有する特殊ペプチドの翻訳合成、及び翻訳合成後のペプチドの主鎖環状化を行い、達成し

たものである。これまで $\gamma$ アミノ酸含有アミノアシル化 tRNA は不安定な性質であったことから、当該分野では $\gamma$ アミノ酸含有特殊ペプチドの翻訳合成に関する研究はいままで報告されていなかった。そこで申請者はその課題をフェニルアラニンと $\gamma$ アミノ酸とのジペプチド体として用いる事で解決し、 $\gamma$ アミノアシル tRNA を取得し、翻訳系中で $\gamma$ アミノ酸含有特殊ペプチドの翻訳合成に成功したものである。このジペプチドを用いた方法論を6種類の $\gamma$ アミノ酸に適用し、そうする事によって多様な特殊ペプチドの翻訳合成を達成している。さらに第三章では同時に $\gamma$ アミノ酸含有主鎖環状ペプチドについても翻訳系中で合成を行い、それを達成している。 $\gamma$ アミノ酸をジペプチド体で用いている為、翻訳の伸長反応で $\gamma$ アミノ酸を含有させる事は出来なかった。その問題を解決し、多様なペプチドを得るため申請者は主鎖環状化を行っている。これはすなわち、ペプチドの N 末端には $\gamma$ アミノ酸を含有し、C 末端側にはシステイン-プロリン-ヒドロキシグリシンの連続配列を翻訳合成により構築し、システインの持つチオール基によるカルボニル基への求核攻撃をドライビングフォースに、ジケトピペラジンチオエステル中間体を経て N 末端のアミノ基の求核攻撃により主鎖環状化させるという戦略である。中間体の生成後、加水分解により直鎖状ペプチドが主生成物として得られる事が問題点として挙げられたが、申請者はそのペプチドの配列中にシステイン残基を含有させることによりその問題を回避し、 $\gamma$ アミノ酸含有特殊主鎖環状ペプチドの合成に成功している。6種類の $\gamma$ アミノ酸を用いて、加水分解物も得られるものの、主鎖環状ペプチドが得られる事を明らかにしている。さらに申請者はこの主鎖環状化の方法論と、既に報告されている限界希釈 PCR 法を応用する事で、この $\gamma$ アミノ酸含有主鎖環状特殊ペプチドライブラリーを構築し、スクリーニングを行う事が可能であり、薬理活性を持つ $\gamma$ アミノ酸含有主鎖環状特殊ペプチドの取得が可能であると述べている。

第四章の結語では、当該分野における研究の方向性について述べ、そのうえで申請者の行った本研究についての位置づけ、考察及び将来性についてまとめている。

以上より、本論文は特殊ペプチドの翻訳合成によるペプチド創薬の研究分野における新しい重要な基礎技術を提供すると共に、今後、生理活性物質の探索研究に大きく寄与するものと考えられる。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。