

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Development of Warhead-Assisted SIRT2 Inhibitor Peptides by Using Ribosomally Constructed Non-Standard Peptide Libraries

(リボソーム合成により構築した機能性側鎖を有するペプチドライブラリからの SIRT2阻害ペプチドの創出)

氏 名 森本 淳平

### 【第一章：研究背景と目的】

近年、ファージディスプレイや mRNA ディスプレイなどの手法を用いることで、高多様性のペプチドライブラリから迅速且つ簡便に標的タンパク質に結合するペプチドを選択（セレクション）することが可能となってきた。しかしながらこうした手法はタンパク質の阻害剤を獲得するための手法としてはやや非効率的である。なぜなら、こうした手法では標的へ結合するか否かだけを指標にペプチドのセレクションが行われるため、得られたペプチドが標的の活性を阻害するような部位へと結合することは保証されないからである。そこで本論文の第二章では、理論的に設計された阻害剤の構造を導入したペプチドライブラリを構築しこれを mRNA ディスプレイ法によってセレクションすることで、標的タンパク質を阻害するペプチドを効率的に獲得することを目指した。さらに本論文の第三章では、第二章で得られたペプチドの構造を細胞内移行性およびプロテアーゼ耐性の観点から最適化し、*in vitro* だけでなく細胞内でも機能するペプチド阻害剤の創出を目指した。

本論文では、ヒト細胞内に存在する脱アセチル化酵素サーチュインを標的として阻害剤探索を行った。サーチュインは、原核および真核の幅広い生物種に存在する酵素で、 $\text{NAD}^+$  を補酵素として、様々なタンパク質の  $\epsilon$ -*N*-アセチルリシン残基 ( $\text{K}^{\text{Ac}}$ ) の脱アセチル化を触媒する。ヒトでは SIRT1 から SIRT7 までの 7 つが存在しており、それぞれ細胞内での局在や基質タンパク質が異なる。近年、遺伝学的手法によりサーチュインの生体における役割の解明が進んだが、個々のサーチュインの働きの全容は未だ解明されておらず、選択的に強力な阻害剤が分子ツールとして望まれている。これら 7 つのヒトサーチュインの中で、細胞質に存在しチューブリンなどの脱アセチル化を行う SIRT2 は、パーキンソン病などいくつかの神経変性疾患や癌との関連が示唆されており、特に SIRT2 の阻害剤の開発はこうした疾患の治療薬候補化合物の創出という観点からも重要である。

## 【第二章：K<sup>Tfa</sup> 含有ペプチドライブラリの構築と SIRT2 阻害ペプチドの探索】

サーチュインの脱アセチル化反応の機序に基づき、その活性を阻害するアセチルリシンアナログがこれまでに複数設計され報告されている。その一つε-N-トリフルオロアセチルリシン (K<sup>Tfa</sup>) 残基は、K<sup>Ac</sup> よりも強くサーチュインの活性部位に結合する一方でサーチュインによる脱修飾反応の速度が K<sup>Ac</sup> に比べて 10<sup>6</sup> 程度も遅いため、ペプチド鎖中に組み込まれることでサーチュインを阻害する構造となる。本章では、RaPID (Random nonstandard Peptide Integrated Discovery) システムを用いてこの K<sup>Tfa</sup> を含有するペプチドライブラリを構築・セクションし、SIRT2 選択的で強力な阻害剤を効率的に獲得することを目指した。ここで RaPID システムとは、非タンパク質性の構造を含むペプチドライブラリを翻訳により構築しこれを mRNA ディスプレイ法によってセクションする技術である。まず、ペプチドライブラリの鋳型として、AUG-(NNC)<sub>m</sub>-AUG-(NNC)<sub>n</sub>-UGC ([m, n] = [3, 4], [4, 4], [4, 5], [5, 5], [5, 6]) をコードするランダム mRNA ライブラリを調製し、メチオニンを除いて再構成した無細胞翻訳系で翻訳した (図 1 a)。この際、N-クロロアセチル-L-チロシン (ClAc<sup>L</sup>Y) が連

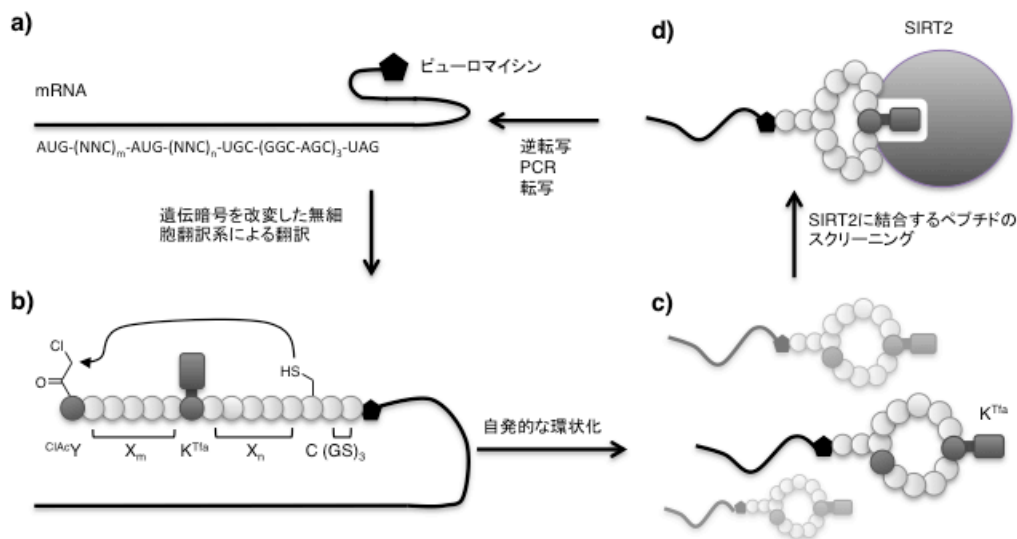


図 1. K<sup>Tfa</sup> 含有環状ペプチドライブラリの構築とセクション

a) ランダム配列を含む mRNA ライブラリの末端にピュロマイシンを連結しておく。b) 翻訳で合成された K<sup>Tfa</sup> 含有ペプチドは、ピュロマイシンを介して mRNA と連結された形で発現される。c) 自発的な環状化により、K<sup>Tfa</sup> 含有環状ペプチド-mRNA 複合体が形成される。d) ペプチド-mRNA 複合体のライブラリから、標的である SIRT2 に結合するものだけを回収する。その後、回収された配列を逆転写・PCR により増幅し、転写することで再び mRNA に変換する。

結された開始 tRNA (tRNA<sup>Met</sup><sub>CAU</sub>) および、K<sup>Tfa</sup> が連結された伸長 tRNA (tRNA<sup>Asn-E2</sup><sub>CAU</sub>) を加えることで、開始 AUG コドンに ClAc<sup>L</sup>Y が伸長 AUG コドンに K<sup>Tfa</sup> がそれぞれ導入され、ClAc<sup>L</sup>Y-(X)<sub>m</sub>-K<sup>Tfa</sup>-(X)<sub>n</sub>-C の配列で表されるペプチドライブラリが合成される (図 1 b)。X で表される部分には、NNC コドンに対応して E, K, M, Q, W 以外の 15 種類のタンパク質

性アミノ酸のいずれか一つがランダムに現れる。また翻訳後には、ペプチド鎖の下流にあるシステイン残基と ClAc 基との間で自発的にチオエーテル結合が形成され、ペプチドが環状化する (図 1 c)。これによりペプチドの構造が剛直化し標的との親和性が向上することが期待される。本研究では、ClAc<sup>L</sup>Y と並行して ClAc<sup>D</sup>Y を用いることで、2つの異なる環状ペプチドライブラリを構築した (<sup>L</sup>Y ライブラリ、<sup>D</sup>Y ライブラリ)。10<sup>12</sup> 程度の多様性からなるこれらの環状ペプチドライブラリを、ピューロマイシンを介して鋳型 mRNA と連結した後、担体に提示した SIRT2 と混合して結合したものを回収することで、SIRT2 に結合するペプチド配列を選択した (図 1 d)。セレクションを複数ラウンド繰り返したところ、<sup>L</sup>Y ライブラリは5ラウンド目で、<sup>D</sup>Y ライブラリは6ラウンド目で、それぞれ SIRT2 に結合するペプチド-mRNA 複合体の回収率が飽和したため、これらの配列をクローニングし、配列を決定した。その結果、<sup>L</sup>Y ライブラリ、<sup>D</sup>Y ライブラリいずれからのクローンにおいても K<sup>Tia</sup> を含む 5 残基が高く保存されていることがわかり、RIK<sup>Tia</sup>RY という配列が SIRT2 との結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

セレクションにより得られたペプチドの活性を定量的に評価するため、上述した阻害モチーフ RIK<sup>Tia</sup>RY を含むペプチドを <sup>L</sup>Y と <sup>D</sup>Y で始まるクローン群からそれぞれ一つずつ選び (S2iL8, S2iD7)、Fmoc 固相法によって合成した。表面プラズモン解析によりこれらのペプチドの SIRT2 への結合能の評価を行ったところ、両ペプチドはそれぞれ K<sub>d</sub> = 3.8 nM, 3.7 nM という強い結合能を示すことがわかった。続いて、これらのペプチドの阻害能を、蛍光を利用した in vitro の SIRT2 活性測定試験によって評価したところ、それぞれ IC<sub>50</sub> = 3.2 nM, 3.7 nM という K<sub>d</sub> 値と一致する強い阻害活性を示した。さらに、同様の in vitro 活性試験によって SIRT2 と同じクラス I に属するサーチュインである SIRT1 と SIRT3 に対する阻害能を決定したところ、いずれのペプチドも SIRT1 に対しては 10 倍程度、SIRT3 に対しては 100 倍程度弱い阻害活性を示し、スクリーニングによって得られたペプチドが SIRT2 選択的な阻害能を有することがわかった (表 1)。

表 1. セレクションで得られたペプチドとその変異型ペプチドの SIRT2 結合能および阻害能

ペプチド名	ペプチド配列	$k_a \times 10^{-6}$ (1/Ms)	$k_d \times 10^3$ (1/s)	$K_d$ (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)		
					SIRT2	SIRT1	SIRT3
S2iL8	Ac- <sup>L</sup> YSNFRIK <sup>Tia</sup> RYNS <sup>S</sup> SC-NH <sub>2</sub>	1.2	4.7	3.8	3.2	47	480
S2iD7	Ac- <sup>D</sup> YHDYRIK <sup>Tia</sup> RYHTYPC <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	1.3	4.8	3.7	3.7	32	240
S2iL8-linear	Ac- <sup>L</sup> YSNFRIK <sup>Tia</sup> RYNS <sup>S</sup> SC-NH <sub>2</sub>	0.98	13	13	6.1	N.D.	N.D.
S2iD7-linear	Ac- <sup>D</sup> YHDYRIK <sup>Tia</sup> RYHTYPC <sup>S</sup> -NH <sub>2</sub>	1.6	17	10	5.5	N.D.	N.D.
RIK <sup>Tia</sup> RY	Ac-RIK <sup>Tia</sup> RY-NH <sub>2</sub>	0.82	67	82	31	280	1,000

$k_a$ ,  $k_d$  および  $K_d$  は SPR によって、また、IC<sub>50</sub> は in vitro のサーチュイン活性試験によって決定した。N.D.: 未決定 (Not Determined)

続いて、直鎖型 (S2iL8-linear, S2iD7-linear) および短鎖型 (RIK<sup>Tfa</sup>RY) のペプチドの評価を行った結果 (表 1)、スクリーニングによって得られたペプチドは、RIK<sup>Tfa</sup>RY の部分で SIRT2 と強く相互作用し、周囲の配列と環状構造によって SIRT2 からの解離速度が押し下げられ、全体として上述したような強力な結合能と阻害能を達成していることが明らかとなった。

### 【第三章：細胞内移行性および分解耐性の向上による細胞内で機能するサーチュイン阻害剤の創出】

サーチュインは細胞内に存在するため、これを阻害するためには阻害剤は細胞内へ効率的に移行して機能しなければならない。第二章で獲得した環状ペプチド S2iL8 および S2iD7 は、*in vitro* では強力に SIRT2 を阻害したものの、細胞内では SIRT2 を阻害することができなかった。そこでこれらのペプチドの細胞内移行性およびプロテアーゼ耐性を評価したところ、いずれのペプチドもこれらが非常に低いことが明らかとなった。

そこで細胞内で機能する阻害ペプチドを創出するためにまず、SIRT2 への結合に重要な RIK<sup>Tfa</sup>RY の 5 残基へとペプチドを短鎖化することで細胞内移行性の向上を図った。続いて、細胞内移行性および分解耐性を低下させると考えられる R 残基を別の残基へと置換もしくは配列中から除去し、RIK<sup>Tfa</sup>TY および IK<sup>Tfa</sup>TY という配列へと変更した。さらに代謝的に不安定である K<sup>Tfa</sup> 残基を安定な  $\epsilon$ -N-チオアセチルリシン残基(K<sup>Tac</sup>)へと変換し、RIK<sup>Tac</sup>TY および IK<sup>Tac</sup>TY という配列へと最適化した。これら 2 つのペプチドは *in vitro* で SIRT1 と SIRT2 への非選択的な強い阻害効果を発揮したため、細胞内でのサーチュインの阻害を試みたところ、いずれのペプチドも細胞内で SIRT1 を阻害することができた。

### 【本論文の結論】

本論文では、まず第二章で、理論的に設計された阻害剤の構造をランダムペプチドライブラリ中に導入することで阻害剤探索の効率化をはかり、実際に SIRT2 に対して *in vitro* で選択的で強力な阻害能を発揮するペプチドを獲得することに成功した。続く第三章では、第二章で得られたペプチドの構造を細胞内移行性およびプロテアーゼ耐性の観点から最適化することで、細胞内で機能するサーチュイン阻害ペプチドの創出に成功した。

第二書で確立した手法は、ペプチドライブラリ中に導入する阻害剤の構造を変えることでサーチュイン以外の様々なタンパク質に対する阻害剤探索へと応用することができる。第三章の研究からは、細胞内のタンパク質を標的とした阻害剤探索において短く R 残基を含まない配列が好ましいということが示唆されており、今後このような知見を活かしたペプチドライブラリの構築およびセレクションを行うことでペプチド阻害剤探索がさらに加速されることが期待される。