

審査の結果の要旨

氏名 水越 弓子

本学位論文は、NMR の手法により、標的タンパク質と結合するペプチドリガンドを迅速に同定し、さらにペプチドの結合状態における詳細な構造解析を行った研究に関するものである。ペプチドリガンドをリードとする低分子薬開発の問題点は、ペプチドリガンドの構造自由度が高いため、活性なコンフォメーションが予想できない点にある。ペプチドのスクリーニングから、標的タンパク質と結合した活性なコンフォメーションでの構造決定、複数のリガンド間に共通の三次元構造の抽出、高アフィニティリガンドのデザインまでの工程を体系的にすすめる必要があると考えられる。従って、標的タンパク質と結合するペプチドを迅速にスクリーニングし、結合状態での構造解析を達成することにより詳細なファルマコフォア情報が得られれば、*in-silico* スクリーニング等の手段により、3次元での活性化合物の探索・同定が可能となり低分子創出への道程が短縮されることが期待される。本論文では、ペプチドリガンドのスクリーニングソースとして、ファージライブラリーを、構造決定の手段として、低アフィニティのものにも応用可能な NMR を用いている。

本論文はファージライブラリーから得られたペプチドリガンドをそのまま、安定同位体ラベルペプチドとし、NMR で結合のスクリーニングを行った研究（第二章）と第二章で得られた複数のペプチドリガンドの結合状態における詳細な構造解析に関する研究（第三章）から構成されている。

第二章では、ファージ粒子からペプチド部分を直接切断できる新規なライブラリーシステムを構築し、同位体ラベルペプチドの調製の効率を上げている。これまで、陽性クローンの選択から同位体ラベルペプチドの獲得まで 2 週間を要していたスキームを、同位体ラベルファージから化学的に切断し、HPLC による 1 ステップの精製スキームに変更できたことにより、3 日間に短縮できている。さらに、同位体ラベルペプチドを用いた NMR 解析により、ファージライブラリーから得られたペプチドの結合活性が迅速に評価できているだけでなく、ペプチドそれぞれの残基レベルでの結合部位の推定や、他のペプチドとの結合様式を解析している。

第二章では先ず、10 残基からなるランダムペプチドライブラリーをファージ上に呈示させている。この際、ペプチド部分の大量発現を可能にするため、ライブラリー部分をファージ中にもっとも多いコピー数を持つ主要外郭タンパク質 g8p に融合している。また呈示量の調節が可能ないように、ファージミド内の lac プロモーター下流にファージライブラリ

一をコードする遺伝子を挿入している。さらにペプチド部分をファージから化学的に切断可能なように、methionine 残基を変異により導入している。このライブラリーシステムを抗 Fas 抗体に対してスクリーニングし、複数のクローンを得たのち、それぞれを同位体標識用培地で増殖させ、同位体ラベルペプチドを大量に精製している。同位体ラベルペプチドを用いることで、簡便な NMR 測定が適用でき、ペプチドリガンドはその結合能によって取捨選択されている。以上の検討から、本章で構築した新規ライブラリーシステムが、ペプチドリガンドの結合能を判断する迅速なスクリーニング法である事を示した。

第三章では、第二章で得られた FasL と競合した 2 種類のペプチドの結合状態での構造決定を NMR 法により試みている。まず初めに、従来法である原子間距離情報に基づく方法 (Nuclear Overhauser Effect, NOE 法) で決定することを試みているが、両ペプチドとも原子間距離情報は限られたものしか得られず、詳細な構造決定に至っていない。そこで本章では、これを補完する方法としてペプチドの二面角情報を与える交差相関緩和法 (cross correlated relaxation, CCR 法) の適用を試みている。これまで交差相関緩和法をペプチドの構造決定に用いた例は非常に少なく体系的に適用する方法がなかった。ペプチドのどの領域にこの情報を適用できるのか、またどのような測定条件にするか、得られた結果を構造決定時の拘束条件にする方法を検討し、ペプチドの構造決定を行っている。NOE 法で得た情報に交差相関緩和法で得た情報を加えることで、ペプチドの結合状態における構造の収束度は顕著に上昇している。また変異体を用いた SPR 実験から重要残基の特定を行っており、両ペプチドについてそれぞれ不連続な 3 残基を同定している。二つのペプチドを重要残基を含む領域同士、主鎖で重ね合わせたところ、非常によく重なり、重要残基の側鎖の方向も両ペプチドで一致していた。この領域がファルマコフォアであると考えられる。弱い結合能を示す複数のペプチドリガンドから三次元でのファルマコフォア情報が得られたことは、ペプチドリガンドからの低分子創出研究に貢献できると考えられる。

以上、本研究は、これまでスクリーニングソースとしてのみ利用されていたファージライブラリーを、ペプチドを融合する一つのタンパク質として活用し、ペプチドを呈示したファージから直接ペプチドを精製した初めての例である。また NMR 解析可能な収量が得られるため、他のアッセイ系にも適用できるペプチド作製法であると考えられる。

さらに、転性交差相関緩和法によるペプチドリガンドの標的結合状態での体系的な二面角情報の取得法は、結合の弱いペプチドリガンドでは他にこの二面角情報を得る手段がないため、これまで構造が明らかにできなかったペプチドリガンドの構造を解析する有用な方法であると期待されることから、本研究は博士 (薬学) の学位授与に値すると判断した。