

審査の結果の要旨

氏名 下舞 大

下舞 大氏はリボソームによって翻訳合成されたペプチドの新たな環化手法、そしてその手法で構築した環状ペプチドライブラリーを構築し、疾患関連タンパク質に対するアフィニティーを指標としたスクリーニングを行った結果、環状ペプチド阻害剤を獲得した。

Chapter 1 では、環状ペプチドの生理活性を発揮する上での構造上の優位性およびその医薬基盤としての重要性について記載した。そして各種環状ペプチドライブラリーの構築手法を紹介した上で、その限界や問題点に触れ、それらに対する翻訳反応によるペプチドライブラリーの合成法の利点について述べた。翻訳合成されたライブラリーから得られた環状ペプチドにも、未だ細胞膜透過性という問題があることを解説し、それに対するひとつの戦略として、翻訳反応の開始に **chloromethy benzoic acid** を用いることで、ペプチドの環化に使用されるアミノ酸残基を減らし、環状ペプチドの小型化ならびに水素結合ドナー・アクセプター数の減少を実現した環状ペプチドライブラリーの構築を解説した。次に、標的として選択したタンパク質である **SHP2 (Chapter 2)** および **PR-Set7 (Chapter 3)** の各種疾患との関連について記述した。

Chapter 2 では、NS や JMML、乳癌、胃癌との強い関連が示唆されている非受容体型チロシンホスファターゼである **SHP2** を標的として、Chapter 1 で記述した新規ペプチドライブラリーから、**RaPID** システムによって結合活性を有する環状ペプチドのスクリーニングを実施した。次に、膜透過性を期待して、さらにランダム領域のアミノ酸残基数の減少、有電荷残基の排除、*N*-メチルアミノ酸の導入を施した疎水性環状ペプチドライブラリーを再構築し、同様にスクリーニングを行なった結果、サブ-数 μM の IC_{50} を有する環状ペプチド阻害剤を獲得した。しかしながら、蛍光修飾したペプチドを用いた細胞アッセイの結果からは、これらの環状ペプチド阻害剤は細胞膜透過性を有していないことが示され、本戦略によっては環状ペプチドに細胞膜透過性を付与することはできないことが実証された。

Chapter 3 では、白血病や癌の浸潤に関与するヒストン **H4** メチル基転移酵素を標的として、Chapter 2 と同様に **RaPID** システムによって結合を指標としたスクリーニン

グを行なった。In vitro display 法では、一般的にシーケンス解析の結果から出現頻度の高いものが重視されがちである。もちろんそうした配列は標的への結合能が高いことが多いのは事実であるが、結合能の高さは必ずしも阻害能が高いことを意味しない。そこで Chapter 3 では、PR-Set7 への結合能を指標に得られた配列から、できるだけ幅広い配列を固相合成し、まず PR-Set7 の酵素活性に与える影響を検討した。このスクリーニングの結果、阻害能を有するものだけでなく、驚いたことに活性を促進するものも確認された。この結果は結合指標スクリーニングで得られた候補を、幅広く活性に基づく in vitro アッセイによるスクリーニングを実施することによってアゴニストを獲得することもできるという可能性を示した。

以上、本博士論文では翻訳開始反応にアミノ酸ではないビルディングブロックである chloromethyl benzoic acid を用いることで、新たな環状ペプチドライブラリーを構築し、そこから標的酵素の活性を調節する環状ペプチドを獲得可能であることを実証した。巻末に自己切断活性ペプチド触媒の配列探索に関する研究を appendix として掲載した。この研究では mRNA display 法に基づいてアミド結合を切断する触媒を人工的に生み出すことを目指した。実験系に未だ改善すべき余地があり、目的の活性を有するペプチドの獲得そしてその解析までには至らなかったが、6 残基の保存配列を見出している。高いバックグラウンドが現行の系の最大の問題であると考えており、これを抑制するための対策案について議論されている。

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。

以上より、本論文では新規環状ペプチド阻害剤のライブラリーを構築し、その有効性が実証されている。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と認められる。