

論文審査の結果の要旨

氏名 OTERO RAMIREZ, Manuel Emilio

(オテロ ラミレス マヌエル エミリオ)

肺発生中では細胞挙動を取り締まる機構が複数あるといわれるが、その中でも発生軸及び細胞運命決定に関わる遺伝子転写制御をコントロールする Wnt シグナル伝達と呼ばれるシグナル経路は、その中枢経路として存在していることが知られている。その伝達経路では、Wnt タンパク質と Frizzled レセプター (Fz) の相互作用がトリガーとなって、通常に塞がっている遺伝子の転写を可能にする。これらの Wnt 伝達は数十年前から知られている一方で、実際に Wnt タンパク質における研究、特にその相互作用を人工的にモジュレートする化合物の発見は、同機構の他のタンパク質に比べ著しく遅れている。Wnt タンパク質のセリン残基が脂質化されることが機能発現に必須であり、この翻訳後修飾によって Wnt タンパク質の疎水性が著しく高くなるため、細胞外環境において凝集等を起こしやすく、活性構造を維持できなくなる点にある。しかし、近年になり、Wnt タンパク質を非特異レセプターである Afamin や特異レセプターである Fz と複合体を取らせることで単離精製することに成功した例が報告された。

本博士論文で主に3章から成る。第1章は序論であり、Wnt伝達の種類(β -カテニンを介する標準経路又は非古典的経路も含め)を記述し、Wntタンパク質の特性や同経路の他のタンパク質やレセプターとの相互作用を詳細に述べた。加えて、病気(主にがん)に関わるWntシグナル経路の影響を表示した。さらに、現在まで開発された同経路(Wnt以外のタンパク質)をターゲットする治療薬や発見技術も概説をしている。

第2章では、血清アルブミンタンパク質hAFMとmWnt3aタンパク質の複合体を用いることで、mWnt3aが細胞外の環境でも沈殿を防ぐことができることを踏まえ、RaPIDシステムを利用した大環状ペプチド検索に適していることの仮説を立て、それに基づいた研究計画を建てたことを述べている。しかし、実際の研究結果は、共存するhAFMに結合親和性をもつ特殊ペプチドの出現をネガティブセレクションで十分に抑えきれず、結果としてhAFMに結合する大環状ペプチドとmWnt3aに特異的に結合する大環状ペプチドの混合配列として同定された。そこで筆者は、セレクションで回収した結合するペプチドの二次元配列解析を適用することにした。この二次元配列解析とは、deep-sequencingによって得られたhAFMのみから単離されたペプチド配列と複合体から単離された配列を比較することで、複合体から単離された配列からhAFMに結合する配列を差し引き、その中でmWnt3aに特異的に結合するペプチド配列を同定する方

法論である。事実、筆者らが考案したこの方法で、mWnt3a だけに結合するペプチドを同定することに成功した。この章では、同定した配列を有する化学合成した大環状ペプチドの定量的な結合親和性（平衡解離定数、 K_D ）の決定、および Wnt シグナル伝達に依存するルシフェラーゼ発現系を指標にした生物活性種の検証を行い、世界で初めて Wnt タンパク質の直接結合により Wnt 伝達を阻害する化合物、WAp-D04 の発見に至ったことを述べた。さらに、本章では、このペプチドの活性の向上を目指し、その配列を無作為に 50%ランダム化したライブラリーを作製して再スクリーニングを行い、10 位のトリプトファンがプロリンに変異した WAp-D04W10P の同定に成功した。詳細な結合親和性および生物活性の検討により、元のペプチドの K_D が約 8 倍及び IC_{50} (50%阻害濃度) が約 5 倍を減じた（すなわち、それぞれの倍数で活性が向上した）こと確認した。

第 3 章では mWnt3a-hAFM を用いたセレクション成果と発見された阻害ペプチド配列の作用機序について考察している。本研究で同定した大環状ペプチドは、レセプターである Fz の結合部意と直接的に競合するのではなく、アロステリックに阻害する可能性について議論している。また探索によって同定されたペプチドの中には、Wnt 伝達活性化を促進するペプチドも発見できている点についても議論している。これらの詳細な作用機序の解明は、mWnt3a 単体、あるいは mWnt3a-hAFM や mWnt3a-Fz を用いた共結晶構造の解析等を待たなければ

ばならないが、今後の展開について言及している。

第4章の結論では、本論文で行った研究成果をまとめている。また、本章ではこれまでに報告されている細胞内シグナル経路低分子阻害剤との比較を考察することで、本研究の特徴を記述している。

以上のことより、本審査会委員は総意のもと、オテロ ラミレス マヌエル エミリオ氏の学位請求論文は博士(理学)の学位授与に十分資するものと認め、合格の判定を下した。