

論文の内容の要旨

論文題目 A study on conformationally constrained peptoid with alanyl backbone toward development of inhibitors of intracellular protein-protein interactions
(細胞内タンパク質間相互作用阻害剤の開発に向けた配座制御された主鎖アラニン型ペプトイドの研究)

氏 名 福田 泰啓

第1章. 緒言

タンパク質間相互作用 (PPI) は、幅広い細胞内シグナル伝達に関わっており、また、PPIの異常は様々な疾患の原因となっている。そのため、生体機能の理解や疾病治療に向けて、細胞内PPIを制御・阻害可能な分子の開発は重要である。

ペプチドは、高い親和性でタンパク質を認識でき、PPI阻害剤への応用が期待されているが、細胞膜透過性の低さが課題となっている。オリゴN置換グリシン (oligo-NSG) は、ペプトイドと呼ばれ、高い細胞膜透過性からペプチドに代わる細胞内PPI阻害剤の候補骨格として注目されている。しかし、oligo-NSGは主鎖が柔軟であるために、一部の例外を除いてタンパク質結合親和性が低い。そこで、水中で特定の立体構造を剛直に形成するペプトイドの開発が求められてきた。

立体配座が制限されたペプトイドの実現に向け、oligo-NSGの α 炭素上にメチル基を導入したオリゴN置換アラニン (oligo-NSA) が提唱された。Oligo-NSAは、主鎖上の擬似的1,3アリル歪みにより主鎖二面角の回転が制限される。しかし、oligo-NSAが実際に剛直な立体構造を形成しているのか、ペプトイド主鎖骨格の剛直性がタンパク質認識に有利に寄与するのかは明らかになっていなかった。

これらの背景を踏まえ、本研究では、oligo-NSAの効率的な合成手法を確立し、oligo-NSAが擬似的1,3アリル歪みによって制限された立体構造を剛直に形成していること、及び、タンパク質認識におけるペプトイド主鎖骨格の剛直性の重要性の実証を目指した。これにより、PPI阻害剤開発に向けたoligo-NSAの有用性を示す。第2章では、oligo-NSAの立体構造の解明に向け、合成法の確立と立体構造評価を行った。第3章では、ペプトイド主鎖骨格の剛直性の重要性を示すため、oligo-NSAを用いたタンパク質リガンドの設計と評価を行った。第4章ではoligo-NSAの細胞内PPI阻害剤としての応用を試みた。第5章では、本博士論文のまとめと今後の展望について述べる。

第 2 章. 主鎖アラニン型ペプチドの固相合成法の確立と安定立体配座の解明

Oligo-NSG の α 炭素上にメチル基を導入し oligo-NSA とすることで、擬似的 1,3 アリル歪みによってペプチド主鎖骨格の立体配座を制限できると期待される。これを実証するため、第 2 章では、oligo-NSA の効率的な合成法の確立と立体構造解析を行った。

多様な窒素上置換基を持つ oligo-NSA の合成法の確立に向け、Fmoc-alanine とアルデヒドを用いたサブモノマー法による合成を試みた。このような合成手法を用いた先行研究では、嵩高い *N*-substituted alanine 末端への縮合反応効率の低さが課題となり、NSA 構造が連続したオリゴマーの合成は実現していなかった。そこで、縮合剤の検討を行ったところ、非対称酸無水物としてアミノ酸を活性化する EEDQ を用いた場合に最も高い反応効率を得られた。最適化した縮合条件を用いて合成を試みたところ、oligo-NSA を比較的高い収率で得ることができ、oligo-NSA の効率的な合成法の確立に成功した。

次に、擬似的 1,3 アリル歪みによって oligo-NSA がどのような立体構造を形成するのかを調べるため、量子化学 (QM) 計算、X 線結晶構造解析、及び、NMR 構造解析を行った。QM 計算からは、擬似的 1,3-アリル歪みから期待される主鎖二面角が安定であることが示唆された。QM 計算から求められた安定な主鎖二面角をもとに作成した oligo-NSA のモデル構造と X 線結晶構造を比較すると、両者はおおよそ一致し、伸びた立体構造を形成していた。また、2 次元 NMR NOESY からは、結晶構造中で近接している主鎖上の水素同士が水中においても近接していることが分かった。以上から、oligo-NSA は立体構造が擬似的 1,3 アリル歪みによって制限され、水中で伸びた構造を形成していることが示された。

第 3 章. 主鎖アラニン型ペプチドの剛直性の評価と剛直性の分子認識への寄与についての検証

Oligo-NSA は主鎖骨格が剛直であり、oligo-NSG に比べて、タンパク質との高い結合親和性が期待される。第 3 章では、oligo-NSA の立体配座の剛直性について評価し、また、タンパク質認識におけるペプチド主鎖骨格の剛直性の重要性について検証した。

Oligo-NSA の主鎖構造の剛直性を、分子動力学 (MD) 計算、電子常磁性共鳴 (EPR) 法によって考察した。MD 計算では、oligo-NSA 主鎖骨格の変動を α 炭素の初期配座に対する平均二乗偏差により評価し、oligo-NSA 主鎖骨格が oligo-NSG に比べて剛直に保たれていることが示唆された。EPR 測定では、オリゴマーの両末端をラジカル標識することで末端間距離分布を調べたところ、oligo-NSA は、oligo-NSG に比べて狭い末端間距離分布が得られた。よって、oligo-NSA の伸びた立体構造が oligo-NSG に比べて剛直に保たれていることが実験的に示唆された。

Oligo-NSA の主鎖骨格の剛直性がタンパク質認識に有利に働くのかを調べるため、MDM2 と p53 の PPI をモデルとし、タンパク質リガンドの設計、及び、その評価を行った。p53 上の 3 つのホットスポット Phe19、Trp23、Leu26 の側鎖の相対配置を模倣すべく、1、3、5 残基目の窒素上置換基に p53 ホットスポットの側鎖を導入した oligo-NSA、oligo-NSG、NSA・NSG 構造を交互に有する oligo-NSA/G を設計した。蛍光偏光法による競合的結合能評価を行ったところ、oligo-NSA が結合能を示したのに対し、oligo-NSA/G は結合能が低下し、oligo-NSG は結合能を示さなかった。この結果は主鎖骨格の剛直性と相関しており、ペプチド主鎖骨格の剛直性がタンパク質認識に重要であることが示唆された。

第4章. 主鎖アラニン型ペプチドを用いた細胞内タンパク質間相互作用阻害剤の開発

Oligo-NSAは主鎖上の立体反発によって剛直な立体構造を実現しており、その構造は窒素上置換基に依存しない。よってoligo-NSAは、各モノマーを置換基の異なる別のモノマーに置き換えることで、主鎖構造を保ったまま、活性向上のための各置換基の最適化が可能であると期待される。本研究の場合、MDM2側に提示されていると予想される1、3、5残基目の置換基を改変することで結合能を向上し、認識面とは反対側に提示されていると予想される2、4残基目の置換基を適切な脂溶性の置換基に改変することで、相互作用に悪影響を与えずに細胞膜透過性を向上できると考えられる。第4章では、oligo-NSAの剛直性を活かした本手法の提案、及び、手法の妥当性の実証を試みた。

まず、各置換基の最適化を行ったところ、1、3、5残基目の置換基、及び、2、4残基目の置換基をそれぞれ独立して最適化することで結合親和性、細胞膜透過性の向上に成功した。次に、置換基の最適化前後で主鎖構造が保持されているのかを評価すべく、NMR構造解析を行った。ROESYスペクトル上で主鎖二面角の制限を示唆する相関ピークが見られ、そのパターンが両者で一致したことから、oligo-NSAの主鎖構造が保たれていることが示唆された。続いて、oligo-NSAとMDM2の複合体のMD計算により、結合時の立体構造を評価した。Oligo-NSAの伸びた立体構造が保たれ、1、3、5残基目の置換基がMDM2と相互作用し、2、4残基目の置換基が溶媒側に露出している様子が確認され、置換基最適化に向けた上記戦略の妥当性が示唆された。

最後に、置換基を最適化したoligo-NSAの細胞内活性を評価した。MDM2とp53の相互作用が阻害されると、p53存在量が向上しアポトーシスが誘導される。置換基改変後のoligo-NSAでMDM2過剰発現細胞を処理し、western blottingによりp53の存在量を、Annexin Vアッセイによりアポトーシス誘導能を、それぞれ評価したところ、oligo-NSA濃度依存的にp53の分解が低下することと細胞のアポトーシスが誘導されることが確認された。以上から、oligo-NSAの高いモジュラリティを活かして各置換基を独立して最適化することで、MDM2結合能、細胞膜透過性を向上し、細胞内PPIを阻害するペプチドの開発に成功した。

第5章. 結言

本研究では、主鎖骨格が柔軟なためにタンパク質親和性が低いというoligo-NSG型ペプチドの課題を克服すべく、oligo-NSA型のペプチドに着目した。Oligo-NSAの効率的な合成法の確立、立体構造解析、及び、タンパク質リガンド設計を通して、(1) oligo-NSAが擬似的1,3アシル歪みによって制限された伸びた構造を剛直に形成すること、(2) 主鎖の剛直性がタンパク質認識に重要であることを初めて実証した。さらに、oligo-NSAの剛直性を活かすことで、結合親和性と細胞膜透過性の改善に向けて、主鎖の立体構造を保ったまま各置換基を独立して最適化するという戦略を着想し、細胞内PPIを阻害するペプチドの効率的な開発に成功した。今後、oligo-NSAと同様にモノマー単位で立体構造が制御される新たなモノマーの開発や、本研究で提案した設計戦略の適用によって、多様な細胞内PPIを標的として阻害剤の開発が可能になると期待される。