

## 審査の結果の要旨

氏名 新原光貴

新原光貴氏の博士論文は4章から成る。第1章は、イントロダクションであり、環状ペプチドの利点とそのスクリーニング手法と構造を持たないまたは部分的な構造を持った天然変性タンパク質 (IDP)について総括されている。第2章は IDP の例として B 型肝炎ウイルス(HBV)表面の preS1 について記述され、preS1 への random non-standard peptide integrated discovery (RaPID) system を用いた環状ペプチドスクリーニングの成果が記載されている。さらにスクリーニング後の更なる阻害活性向上のためのアプローチについても記載されている。第3章は環状ペプチドの中でも主鎖環状ペプチド(BMP)に焦点を当てて BMP が総括されている。また BMP ライブラリを用いた RaPID system の cMet、Akt2、Ankyrin repeat(AR)タンパク質への応用、異なる環化様式のチオエーテル環状ペプチド(TMP)との比較が記載されている。第4章は本論文の内容が総括されている。以下各章の詳細を述べる。

第1章は、本文の序論として、環状ペプチドの薬剤としての有用性、現存の環状ペプチドスクリーニング法と RaPID system について記述されている。また IDP と IDP 阻害剤創出上の問題点について記載されている。環状ペプチドはその剛直性から高い標的特異性、生体内安定性など薬剤として魅力的な性質を持っている。生理活性の持つ環状ペプチドを発見するため、これまでに One-beads-one-compound(OBOC)法や phage display 法、split-intein circular ligation of peptides and proteins (SICROPPTS)法により、それぞれ  $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  の多様性を持つ環状ペプチドライブラリからのスクリーニングがされてきた。これに対して、我々の研究室では  $10^{12}$  ものライブラリからスクリーニングの可能な RaPID system と呼ばれる手法を開発し、より効率の良いペプチド探索を可能とした。この技術はではペプチドの C 末端にそのペプチドをコードする mRNA が結合しており、この mRNA の配列解析を行うことで、ペプチドが同定できる。標的となる疾患原因タンパク質の多くは秩序だった三次元構造を持つが、そのような構造を持たない IDP も疾患の原因として注目されている。また IDP は変異のしやすい数多くのウイルスにも存在することが判明してきている。しかしながら、IDP はその構造的特徴から阻害剤の rational design が困難であった。また低分子スクリーニング系を用いて獲得した阻害剤は低い結合力、低い特異性を示し、副作用を引き起こすことが問題であった。この問題点を解決するため、スクリーニングを用いた環状ペプチド阻害剤創出が期待された。これまでに SICROPPTS によって IDP に対する環状ペプチド阻害剤の例はあったものの、RaPID system においては報告例がなかった。そのため、IDP 標的に対するスクリーニングに用いられるライブラリの多様性は  $10^9$  に留まっていた。

第2章では IDP の一つである B 型肝炎ウイルス(HBV)表面の preS1 をモデル標的として、RaPID system の IDP への有用性を示している。preS1 は肝細胞受容体 sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)に結合し、HBV の侵入に寄与しているタンパク質であり、新たなメカニズムを有する HBV 阻害剤標的として注目されている。RaPID system の結果、新原光貴氏は HBV 感染を防ぐ TMP である PSL1 の獲得に成功し、これにより RaPID

system が IDP に応用可能であることを示した。またスクリーニング後のアプローチとして、天然アミノ酸への置換を行い、PSL1 より高活性な DMt2 の獲得に成功している。さらに DMt2 をベースとして、他の非天然アミノ酸への置換、二量化、Fc へのグラフティングが検討されている。最終的に DMt2 が最も活性のある TMP であった。

第 3 章では、主鎖環状ペプチドを RaPID system に応用したことを報告している。環状ペプチドはその環化法により側鎖-側鎖環状、主鎖-側鎖環状、主鎖環状ペプチド(BMP)に分かれ、その中でも BMP は最も剛直な構造をもち、エキソペプチダーゼへの耐性もある。さらにシクロスポリン A のような天然環状ペプチドは BMP であることが多い。このような背景から BMP は薬物候補として魅力的である。しかしながら、BMP は C 末端が存在しないため、RaPID system に応用することができなかった。この問題を開発するため、新原光貴氏は高辻諒博士が開発した mRNA を BMP にペプチド側鎖を介して結合させるという方法を用いて、BMP ライブラリを構築した。さらにその BMP ライブラリを cMet、Akt2、AR タンパク質に応用することで、BMP の RaPID system への応用を証明している。その結果、いずれのタンパク質においても、数 nM~数百 nM の  $K_D$  を持った高い結合力を有する BMP の獲得に成功し、Akt2 に対しては 24.4 nM の  $IC_{50}$  を持つ阻害剤の獲得している。また cMet、Akt2 のスクリーニングで得られた BMP は同様の配列を持つ TMP よりもおおむね強力な結合力を有しており、主鎖環状構造の結合力への寄与が示されている。さらにそれらの Protease K に対する分解抵抗性も同様の配列を持つ TMP は高く、主鎖環状構造の剛直性によるプロテアーゼ抵抗性の寄与が示唆されている。

第 4 章は、本論文全体の結論、および今後の展望について記述している。本論文において新原光貴氏は RaPID system の preS1 阻害剤の獲得により、RaPID system の IDP への応用を証明した。RaPID system は他の環状ペプチドスクリーニング法よりもライブラリの多様性が大幅に高いため、より効率の良い IDP 阻害剤獲得が期待される。また BMP の RaPID system への応用により、新規 BMP スクリーニング手法の開発に成功した。これにより BMP に既存の手法である SICROPSS よりも多様性を持つライブラリからのスクリーニングを可能とした。最後に本論文は標的汎用性、ライブラリのケミカルスペースの二つの観点から RaPID system の実用範囲を広げ、ペプチド創薬発展に大いに貢献したと総括されている。

なお第 2 章は国立感染研究所の渡士幸一氏、村松正道氏、岩本将士氏、大橋啓史氏、塩野谷果歩氏との共同研究であるが、新原光貴氏が主体となって分析および検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。また第 3 章においては研究のほぼ全てを新原光貴氏が中心として行った。

以上のように、新原光貴氏の博士論文は、阻害剤の創出の困難な IDP に対してペプチドスクリーニング手法を駆使して阻害剤創出を示し、かつ BMP の新たなスクリーニング手法を開発した画期的な研究であり、ペプチドサイエンス、ケミカルバイオロジーの分野の研究に大きな貢献をしたと言える。したがって、新原光貴氏に博士(理学)の学位を授与できると認める。