

論文審査の結果の要旨

氏名 山口 淳

主鎖骨格の *N*-アルキル修飾や大環状骨格を有するペプチド（特殊ペプチド）は、タンパク質性アミノ酸のみからなる直鎖状ペプチドと比較して、構造の剛直性や生体内安定性、細胞膜透過性が優れていることから、新たな薬剤・バイオツール候補として注目されており、実際に複数の天然物由来の特殊ペプチドが医薬品や研究用ツールとして用いられている。本博士論文では、天然物様特殊ペプチドの高多様性ライブラリーを人工的に構築し、癌などの重大な疾病に関与している細胞内タンパク質分解経路関連タンパク質に対しセレクションを行うことで、新たな薬剤及び研究用ツール候補となる特殊ペプチドの探索を達成するという独自性の高い研究を行っている。

本論文は 5 章からなる。第 1 章は序論であり、特殊ペプチドの有用性と人工的な特殊ペプチドの高多様性ライブラリー構築の難しさ、ライブラリー構築に用いられた遺伝暗号のリプログラミング技術と翻訳技術について述べられている。また、特殊ペプチドの探索に用いられた翻訳を用いたセレクション技術の特長についても言及されている。

第 2 章では天然物様特殊ペプチドの高多様性ライブラリーの構築について報告している。遺伝暗号のリプログラミングで導入した *N*-クロロアセチル-*D*-トリプトファンと天然のシステインを用いたペプチドの環化法における問題点を指摘するとともに、山口氏は天然のシステインをあえて翻訳系から除き、遺伝暗号のリプログラミング技術を用いて別のコドンにシステインを指定し直すことによってこれを解決できることを示した。また、上記 2 種類のアミノ酸の他に主鎖骨格の *N*-アルキル修飾のための 5 種類の非タンパク質性アミノ酸も導入した翻訳系を構築し、調整した mRNA を翻訳することで、 10^{12} 種という非常に高い多様性を持った天然物様特殊ペプチドライブラリーの構築に成功している。更にこのペプチドライブラリーをペプチドのサイズによって 2 つに分割することにより、標的結合能だけでなく細胞膜透過性など他の特長を持った特殊ペプチドの探索を可能としたことについても述べられている。

第 3 章では第 2 章で構築した天然物様特殊ペプチドライブラリーを用いて、ヒトのオートファジー関連タンパク質である hAtg3 に対し結合能を示すペプチ

ドの探索を行っている。山口氏はその結果、12 種類の大環状ペプチドの探索に成功した。探索されたペプチドの多くは複数箇所主鎖骨格の *N*-アルキル修飾を有しており、最も多いものでは 9 残基のペプチドに 5 箇所主鎖骨格の修飾を有していた。探索されたペプチドは hAtg3 に対し 17 nM~4.40 μ M の解離定数を示すなど非常に強い結合能を示した。これは、hAtg3 に結合を示す特殊ペプチドの探索に世界で初めて成功したものであり、既存の hAtg3 結合化合物である抗 hAtg3 抗体と比較し非常にサイズの小さいことから、hAtg3 の細胞内での動態研究など hAtg3 の機能解明に大きな貢献を果たすと考えられ、非常に重要な成果である。

第 4 章では、ユビキチン-プロテアソームシステム関連酵素である Smurf2 に対し結合能を示すペプチドの探索を行っている。その結果 4 種類の特殊ペプチドが探索され、その全てが複数の主鎖骨格の修飾を持っており、最大で 13 残基の大環状ペプチドに 7 ヶ所主鎖骨格の *N*-アルキル修飾が含まれていた。得られたペプチドの Smurf2 に対する解離定数は最も強いもので 71.9 nM であった一方で、同じアミノ酸配列で主鎖骨格の *N*-アルキル修飾や大環状骨格のないペプチドは最大で 51 倍結合能が弱くなった。これらの結果は Smurf2 の過剰発現が見られる癌に対する新たな薬剤候補の探索に成功しているのと同時にペプチドの構造の違いによる標的結合能の変化の研究にも繋がるものであり、重要な成果である。

第 5 章は結論であり、研究全体のまとめと将来への展望について述べられている。本博士論文において、システインの遺伝暗号を書き換えることで、大環状骨格を有したペプチドのみで構成された特殊ペプチドライブラリーの構築に成功することのみならず、システインの発現位置を操作することで意図的に投げ縄型ペプチドを発現させ、ペプチドの構造の多様性をコントロールする法を示すなど、更なる応用性を示した。またより多くのタンパク質に対しペプチドセレクションを行うことで、薬剤候補となる多様な天然物様特殊ペプチドの高効率な探索に繋がることが期待される。

尚、本論文第 3 章は水島昇教授との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上のことより、本審査会委員は総意の下、山口淳氏の学位請求論文は博士(理学)の学位授与に十分資すると認め、合格の判定を下した。