

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 張 静

近年、不適切なタンパク質間相互作用が疾病の原因となっている数々の例が知られるようになり、このような不適切なタンパク質間相互作用を阻害する低分子化合物、ペプチド、抗体など様々な生理活性分子の治療薬としての応用開発が進められている。ペプチド性阻害剤はその高い特異性、比較的廉価な生産コストなどの点で治療薬として有望視されているものの、血中での安定性が低いことが治療薬として応用する際の問題点として挙げられていた。本論文は、安定性が極めて高いセリンプロテアーゼ阻害剤として知られているヒマワリ種子由来の 1 カ所の S-S 結合を含む環状化ペプチド(SFTI-1)をスカフォールド分子として用い、これにペプチド性阻害剤をグラフティングすることによって血中安定性に優れたペプチド性阻害剤を創製する技術の開発を目指したものである。基質選択性に優れたペプチド転移酵素 Sortase A (SrtA) を利用した環状化ペプチドの細胞外あるいは細胞内での作製技術の開発、SFTI-1 にグラフティングしたペプチド性阻害剤の模擬血清中での安定性の評価、生物発光・蛍光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法を用いた細胞外あるいは細胞内における環状化ペプチドのタンパク質間相互作用阻害活性評価技術の開発を行い、その成果をまとめたものである。本論文は以下の 6 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景、目的と概要を述べ、本論文の構成を示している。

第 2 章では、Ca イオン依存性を有するブドウ球菌由来の SrtA を利用した環状化ペプチドの細胞外での作製技術について検討している。ここでは、神経系細胞に高発現している *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の細胞内 C 末端サブユニット NR2B と細胞内スカフォールドタンパク質 (Postsynaptic Density Protein-95) の PDZ2 ドメインとの相互作用を阻害することが知られている 4 アミノ酸残基長のペプチド ESDV をモデルペプチド性阻害剤として用いている。S-S 結合によって区切られる環状化 SFTI-1 の短いループ領域のアミノ酸配列 FPDG をこのペプチドに交換した SFTI-1 の N 末端、C 末端に、SrtA の認識アミノ酸配列である GGG、LPETGG をそれぞれ連結したペプチドを固相合成し、これを基質として環状化ペプチドの構築を行った。その結果、ESDV ペプチドをグラフティングした環状化 SFTI-1 ペプチドを 65% 以上の高収率で酵素合成することに成功している。また、ヒト血清中での安定性は、SFTI-1 にグラフティングしない直鎖状のペプチドの場合には 4 時間で完全に分解されるのに対して、20 時間後の分解率が、SFTI-1 にグラフティングした直鎖

状ペプチドでは約 50%、S-S 結合が形成されない還元状態の環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドでは約 25%であり、さらに S-S 結合が形成される酸化状態ではほとんど分解が認められず、著しく安定化されることを見出している。

第 3 章では、SrtA による環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドの酵素合成を動物細胞内で行うための前段階として、SrtA の認識アミノ酸配列 GGG、LPETGG をそれぞれ N 末端と C 末端に導入した蛍光タンパク質 GFP を用いて、その N 末端-C 末端環状化反応効率を指標として種々の条件検討を行っている。動物細胞内は Ca イオン濃度が 100nM 程度と極めて低いため、本章では Ca イオン依存性の無い連鎖球菌由来の SrtA を用いている。SrtA 遺伝子導入法を用いて細胞内で SrtA を一過性発現させた場合と、種々のタンパク質細胞内導入法を用いて SrtA を細胞内に導入した場合について、GFP の N 末端-C 末端環状化反応の効率を比較した結果、遺伝子導入法による SrtA の一過性発現方法が、細胞内 SrtA 濃度を高め、効率的に環状化反応を行うのに適していると結論づけている。

第 4 章では、GGG-グラフティング SFTI-1- LPETGG ペプチド配列を N 末端に導入した GFP 遺伝子と SrtA 遺伝子を動物細胞に共導入し、動物細胞内での環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドの酵素合成を試みている。その結果、細胞外での酵素合成反応効率と比較すると劣るものの、動物細胞内においても環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドの酵素合成が可能であることを明らかにしている。また、このような方法を用いて、グラフティングするペプチド配列を種々に変えた環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドライブラリーを細胞内で酵素合成することが可能となれば、細胞内の様々なタンパク質間相互作用を阻害、あるいは活性化するペプチド配列を細胞内でスクリーニングする系の構築も将来的には期待できると述べている。

第 5 章では、発光酵素と蛍光タンパク質の N 末端にそれぞれ PDZ2 ドメイン、NR2B を融合したキメラタンパク質同士の PDZ2 ドメインと NR2B の相互作用により BRET が起こり、阻害性ペプチドが存在すると競合的に BRET 解消が起こることを利用した、阻害性ペプチドのタンパク質間相互作用阻害活性評価技術の開発を行っている。細胞外、細胞内の双方で ESDV ペプチド配列をテンプレートとする種々のペプチド配列をグラフティングした環状化グラフティング SFTI-1 ペプチドの阻害活性を評価した結果、ハイスループット性には若干欠けるものの、基質となる GGG-グラフティング SFTI-1- LPETGG ペプチドや SrtA や、BRET 評価系の融合タンパク質の濃度を厳密に制御することが可能な細胞外での BRET 評価系の方が、精度の高い評価系であると結論づけている。

第 6 章では、本研究の結論と展望について述べている。

以上、本論文はタンパク質間相互作用を阻害する血中安定性が高い環状化ペプチドの効率的な酵素合成法の開発と、BRET 法を用いた環状化ペプチドの阻害活性の簡便かつハイスループットな評価系の構築を行ったものであり、タンパク質工学、ペプチド工学などケミカルバイオエンジニアリング分野の発展に対する寄与は大である。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。