

論文審査の結果の要旨

氏名 バシルディン ナセル 加藤

これまでの医薬品として開発されてきた薬の多くは、G タンパク質共役受容体 (GPCR) やイオンチャネル、トランスポーターといった膜タンパク質を標的としている。それら薬の多くは、細胞内外のタンパク質に関わらず標的にできる有機小分子であり、その性質として膜タンパク質とリガンドタンパク質のタンパク質間の相互作用 (PPI) を阻害する強力な結合力和ファミリー間を区別する高い特異性を求められる。そのような薬剤候補を見出すには高度な3次元構造情報を利用した分子設計が重要であるが、膜タンパク質は結晶化にはしばしば困難が伴う。一方、低分子化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングにより、膜タンパク質の3次元構造情報なしで薬剤探索することも可能だが、初期ヒットで高い活性物質を得ることは極めて希で、その後の展開に多くの時間と労力が必要となる。

本研究室では、標的タンパク質に結合する高活性種を迅速に探索する技術である RaPID システム (Random nonstandard Peptide Integrated Discovery) を開発している。このシステムでは、分子進化学と遺伝子暗号リプログラミング法を用いることで1兆種類のユニークな大環状ペプチドのライブラリーを一挙に構築でき、タンパク質の詳細な情報がなくとも容易に高活性の候補薬剤を発見できる。ペプチドは低分子に比較的近い分子量を有していることから、膜透過性の付与や生産の低コスト化も期待できる。

今回、重要な創薬ターゲットである疾患関連膜タンパク質のうち、有力なリガンドの探索が従来困難であったプレキシシン-B1、 $\alpha 6 \beta 1$ -インテグリン、ニカストリンを標的として生理活性環状ペプチドの RaPID 探索を行った。さらに選択されてきた標的膜タンパク質に対する種々の大環状ペプチドの結合力和その生理活性を精査した。

第1章では、創薬の現状を踏まえ、低分子化合物を用いたスクリーニングおよびタンパク質-タンパク質相互作用の阻害剤探索における現在のパラダイムについて記述している。さらに、環状ペプチドを使った創薬がどのように従来の小分子薬物スクリーニングの欠点を克服できるかが記述されている。

第2章では、膜タンパク質プレキシシン-B1 (PlxnB1) を標的として RaPID 探索を行った。PlxnB1 はセマフォリン-4D (Sema4D) と結合する二量体型受容体であり、神経回路の形成、骨の恒常性、癌化など様々な生理現象に関与する。従って、PlxnB1 に対する薬剤候補が探索できれば、様々な疾患に対するリード化合物の発見につながる。PlxnB1 に対する RaPID の結果、環状ペプチド P6 は解離定数が数 nM と非常に強い親和性を有することがわかった。また *in vitro* で PlxnB1 と Sema4D 間における PPI 阻害活性を評価した結果、40nM という強力な阻害活性を示した。さらに、PlxnB1 を発現する生細胞中で成長円錐崩壊試験を行った結果、Sema4D は PlxnB1 を発現する細胞の成長円錐崩壊を起こすが、P6 を加える事によって、成長円錐崩壊を阻害することができた。詳細な PPI 阻害メカニズムを調べる為、P6 と PlxnB1 を共結晶化し、X線結晶解析を行ったところ、2.8 Å の分解能で位相を決定できた。P6 はその強力な阻害活性から、plxnB1-sema4d の結合部位に結合していることが予想されたが、結晶構造から P6 はアロステリックに PPI を阻害しているユニークな阻害形式をとっていることが明らかとなった。注目すべきことに、単量体型の PlxnB1 として初めての結晶構造であったことから、P6 は PlxN1 の結晶構造安定化にも寄与できることがわかった。

第3章では、 $\alpha 6 \beta 1$ -インテグリンに対する RaPID 探索が議論されている。 $\alpha 6 \beta 1$ -インテグリンは、細胞外マトリックスへの細胞の付着に関与する膜タンパク質であり、 $\alpha 6 \beta 1$ -integrin の異常な発現は、腫瘍の転移に関与する。また、 $\alpha 6 \beta 1$ イン

テグリンの活性化は、胚性幹細胞と IPS 細胞培養の自己再生を延長することが示されている。従って、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに対して生理活性を有する環状ペプチドが探索できれば、製薬およびバイオテクノロジーに波及効果が期待できる。RaPID 探索の結果、 $\alpha 6 \beta 1$ -インテグリンに対し非常に強い結合力を有する環状ペプチドを発見することに成功した。しかしながら、細胞アッセイにおいては、いずれの環状ペプチドも強い阻害活性を示さなかった。

PPI の結合部位の表面積は、従来 RaPID で用いる単環状ペプチドの結合面積と比較して大きく上回っているため、より複雑で強固な三次元構造を有するペプチドライブラリーを使うことが望ましい。そこで、第 4 章にリボソームによる三環状ペプチドを合成する手法の開発について叙述している。本手法では、FIT システムを用い四つシステイン残基を有する N 末端クロロアセチル化ペプチドを翻訳する。ここで、N 末端クロロアセチル基は二残基目システインとは反応しないことを見出している。三残基目以降のシステインがクロロアセチル基と反応しチオエーテル結合を架橋部位とした単環ペプチドが翻訳系中で生成する。さらに、1,3,5-トリス（ブromoメチル）ベンゼンの添加で、残る三つのシステインを環化させる三環状ペプチドを合成することに成功した。本研究では環化トポロジーの選択性を証明するだけでなく、ペプチドの長さおよびアミノ酸の種類に依らず三環状ペプチドを形成できることが MALDI-TOF MS 分析により明らかとなった。本手法に確立により、1 兆種類におよぶ三環状ペプチドのライブラリーを RaPID システムに適用することが可能となった。

第 5 章では、ニカストリンに対する RaPID 探索を行っている。ニカストリンは、Notch およびアミロイド前駆体タンパク質の切断に関与する γ セクレターゼ複合体のサブユニットである。ニカストリンは、基質認識サブユニットで、触媒サブユニットであるプレセニリンに基質を受け渡す役割を有している。従って、ニカストリンに選択的に結合する環状ペプチドの探索は、 γ セクレターゼ阻害剤の取得につながる。前述と同様に、RaPID 探索の結果ニカストリンに結合する高親和性大環状ペプチドを得ることができた。Notch シグナリングおよびアミロイド β の産生のための生細胞アッセイで試験した結果、複数個の環状ペプチドが 50% 程度の阻害活性を示した。さらに、取得した環状ペプチドのニカストリンへの結合部位の偏りを精査するため、mRNA ディスプレイを用いニカストリンとペプチドの結合部位競合アッセイを開発した。このアッセイ系ではニカストリンの一箇所集中して環状ペプチドが結合することがわかり、今後標的タンパク質の結合部位を制御して新たな特殊ペプチドを取得できる可能性が示唆された。

第 6 章では本論文の成果と今後の方向性を結論付けている。加藤君は 3 種の異なる病的疾患関連膜タンパク質に対して RaPID 探索を行った結果、全ての膜タンパク質に対して、強力な親和性で結合する環状ペプチドを取得することができた。特に PlxnB1 に対しては非常に有望なアロステリック阻害剤環状ペプチドを得ることに成功した。また、リボソームを用いた三環状ペプチド合成の一般性を明らかにしたほか、ニカストリンに対して結合部位競合アッセイを開発した。これらの知見は RaPID システムの薬剤候補探索として高い有用性を示していることを実証した成果であり、今後の創薬に新しい可能性を示すものである。

第 2、3、6 章では高木淳一教授と松永幸子助教と共同で行われた。第 6 章では、富田泰輔教授と共同で行われた。