

称号及び氏名	博士（理学）	藤原 大佑
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 31 日	
論文名	「立体構造規制ペプチドライブラリーを用いた分子標的ペプチドの創出」	
論文審査委員	主査	藤井 郁雄
	副査	多田 俊治
	副査	徳富 哲

論文要旨

序論

近年、自然界における進化の過程、すなわち「多様性」の創出と「選択」を試験管内で再現した進化分子工学が発展を遂げた。代表例であるファージディスプレイ法は短時間かつ簡便に膨大なサイズのペプチドライブラリー構築を可能とした。しかしながら、従来ライブラリーに用いられてきた低分子ペプチドは柔軟性が高く多様な立体構造をとるため、標的タンパク質結合時のエントロピーコストが大きいことが問題点であった。そこで、本研究では立体構造をもつペプチドを *de novo* 設計し、ペプチドのライブラリー土台分子とした。進化分子工学と *de novo* 設計人工ペプチドを組み合わせた新手法を用いて分子標的ペプチドの創出を試みた(Figure 1)。

2002 年、ヒトゲノムが解読されて以来、新規タンパク質の発見が相次いでいる。生体内の生体分子認識機構を詳細に調べることは生命科学の課題のひとつである。複雑なプロテインネットワークに関与する重要な酵素の一例としてプロテイン・キナーゼが挙げられる。ヒトゲノム中で 500 以上あるプロテインキナーゼはシグナル伝達や代謝調節因子として機能している。特定のプロテインキナーゼのみ制御する特異的リガンドは、分子認識機構を調べる上で重要なツールとなる。さらに、異常型プロテインキナーゼは様々な疾患に関与していることから、特異的阻害剤は医薬品リード化合物としても期待されている。しかしながら、プロテインキナーゼは高度に保存された立体構造を有し互いに類似することから、高選択的阻害剤創出は困難であった。現在、プロテインキナーゼ選択的阻害剤獲得の新規方法論の確立が強く望まれている。

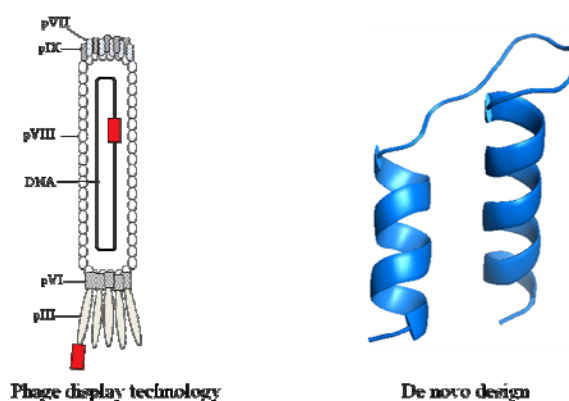


Fig. 1 ファージディスプレイ法と立体構造規制ペプチドの *de novo* 設計を組み合わせた新規リガンド獲得方法。ペプチドを提示したファージ粒子のイラスト(左図)と、*de novo* 設計したペプチドの立体構造(右図)。

第 1 章 ヘリックス-ループ-ヘリックス(HLH)構造を土台とした新規ファージ表面提示ペプチドライブラリーの構築

これまでにヘリックス-ループ-ヘリックス(HLH)構造をもったペプチドが *de novo* 設計された(ペプチド **YT1**; AELAALEAELAALG-G7-KLAALKAKLAALKA). 二つの逆平行ヘリックスは、ロイシンジッパーによる疎水性相互作用および N 末端側ヘリックスのグルタミン酸側鎖と C 末端側ヘリックスのリシン側鎖間の静電

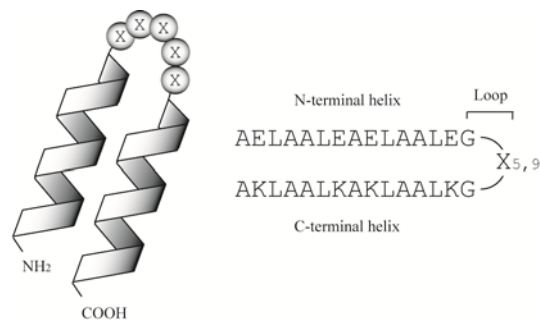


Fig. 2 HLH ペプチドのループ部位のアミノ酸をランダム化したペプチドライブラリー (左図)とアミノ酸配列(右図).

的相互作用により会合し、溶液中で安定な HLH 構造を形成している (Figure 1). これまでに C 末端ヘリックスアミノ酸残基をランダム化した α -ヘリカルライブラリーが構築され、G-CSFR (顆粒球コロニー刺激因子受容体)結合性ペプチド、および、ガングリオシド結合性ペプチド獲得に成功している. 本研究で、HLH ペプチドのループ部位のアミノ酸をランダム化した新規ペプチドライブラリーを構築した (Figure 2).

繊維状ファージのコートタンパク質 pVIII 上に HLH ペプチドを提示したファージ・ライブラリーの作製を行った. ペプチド **YT1** のループ部位をランダム化したライブラリーを構築した. まず、PCR 法によりオリゴヌクレオチドバリエーションを増幅して制限酵素処理を行い、ファージミドベクター pComb8 とライゲーションを行った. 得られたファージミドバリエーションを大腸菌 XL1-Blue 株へエレクトロポレーション法により導入し、VCSM13 ヘルパーファージを感染させてファージ表面提示ペプチド・ライブラリーを構築した (Table 1).

Table 1. ファージ表面提示ペプチドライブラリー

Library	Peptide Sequence	Library Size
Llib-7	AELAALEAELAALG-GXXXXXG-KLAALKAKLAALK A	2.7×10^7
Llib-11	AELAALEAELAALG-GXXXXXXXXXXG-KLAALKAKL AALKA	2.0×10^7

X represents a position of randomized amino acids.

第 2 章 新規ペプチドライブラリーの立体構造規制

一般に低分子ペプチドは多様なコンフォメーションをとり柔軟性が高い. 一方、HLH 構造のループ部位は、2 つのヘリックスによってループ両端が空間的に固定されており可能な立体配座が制限されていると予想される. 本章では、ループの立体構造の対照としてタンパク質の二次構造である β -ターン構造と HLH ペプチドのループを比較した.

β -ターンの代表例である II'型 β -ターン構造をもつ Arg-Gly-Asp (RGD)モチーフはフィブロネクチンなど細胞接着因子に見られる. HLH ペプチドのループに RGD モチーフを導入したペプチドは、受容体インテグリン $\alpha 5\beta 1$ に結合しなかった. 一方で、RGD モチーフをもつ低分子ペプチドは $\alpha 5\beta 1$ に結合した. この結果から、HLH のループ部位は柔軟性が低く、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ に誘導適合しないことが示唆された.

さらに、第 1 章で構築したファージ表面提示ペプチドライブラリーを用いて、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ に対してバイオパンニングを行った. 対照実験として 12-mer ランダムペプチドライブラリーを用いた実験を行ったところ、RGD モチーフを持つペプチドを獲得した. 一方、新規ループライブラリーを用いたバイオパンニングでは RGD モチーフをもつペプチドが得られなかった. これらの結果から、HLH ペプチドのループ部位は低分子ペプチドに比べて立体的構造規制されており、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ に誘導適合しないことが示唆された (Figure 3).

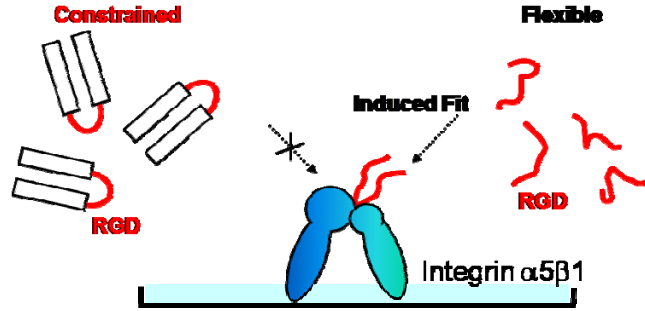


Fig. 3 立体構造規制されたペプチドと柔軟な低分子ペプチド

第3章 オーロラキナーゼ A 阻害ペプチドのスクリーニング

セリン・スレオニン・プロテインキナーゼの一つであるオーロラキナーゼ A 阻害ペプチドの獲得を目指し研究を行った。アフィニティ・セレクションを行うにあたり、プレートへ固定化したオーロラキナーゼ A の酵素活性を確認した。グルタチオン・プレート及び抗 GST 抗体固定化プレートに、GST タグ付きオーロラ A の固定化条件の検討を行ったところいずれの条件でも固定化オーロラ A のキナーゼ活性が維持することを確認した。次に、作製したファージ表面提示立体構造規制ペプチド・ライブラリーを用いてスクリーニング（バイオ・パンニング）を行った。プレートに固定化したオーロラ A に対してバイオ・パンニングを 4 ラウンド行い、各ラウンドでファージの回収率 (%) を記録した (Figure 4)。対照実験としてブロッキング剤のみ固定化したプレートのファージ回収率 (%) を測定した。その結果、オーロラキナーゼ A 結合性ファージクローンが獲得されていることが示唆された。

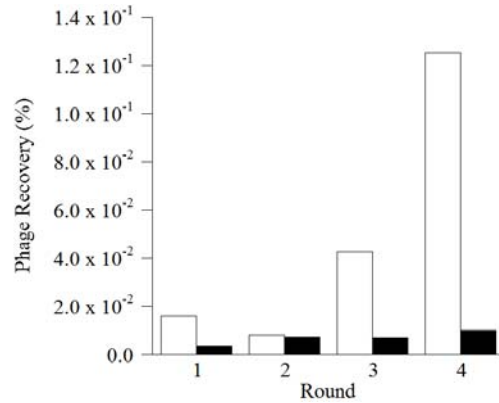


Fig. 4 Aurora-A に対するバイオパンニング。Aurora-A (□) 及びブロッキング剤 (スキムミルク) (■) におけるファージ回収率 (%)

獲得した多数のクローンの中から任意に選択して DNA 配列を確認して 72 クローンの同定を行った。そのうち任意に選択した 52 クローンを用いて ELISA 試験(ファージ ELISA)を行い、オーロラキナーゼ A に対する親和性を調べた (Figure 5)。ネガティブコントロールとして、ペプチドを提示していない VCSM13 ヘルパーファージと、ペプチド YT1 を提示したファージを用いた。その結果、オーロラキナーゼ A 結合性ファージクローンが獲得できたものと結論付けた。

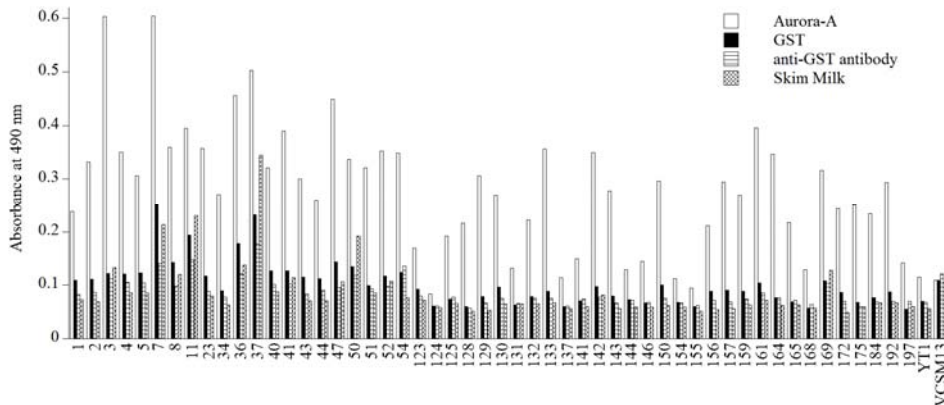


Fig. 5 ファージ ELISA. オーロラ A 結合性クローンの同定.

第 4 章 合成ペプチドを用いたオーロラキナーゼ A の活性阻害試験

ファージ ELISA により同定したオーロラ A 結合性ファージクローンが遺伝的にコードしているペプチドを Fmoc 固層合成法により合成及び精製した。これら合成ペプチドを用いて

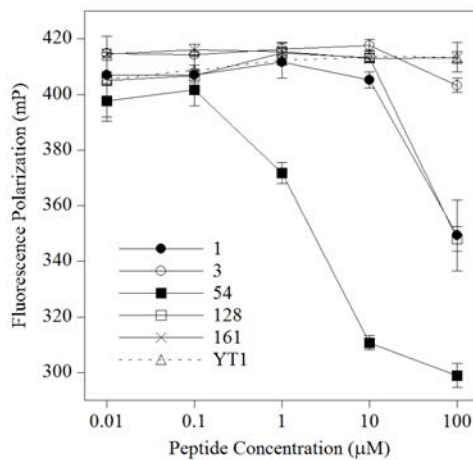


Fig. 6 オーロラキナーゼ A 阻害実験

IMAP 法によるキナーゼ活性阻害試験を行った (Figure 6)。ペプチド **1**, **54**, **128** について濃度依存的にオーロラキナーゼ A 活性を阻害することが確認できた。

最も阻害活性の大きかったペプチド **54** について更に検詳細を検討した。ペプチド **54** のループ部位由来の 11-mer ペプチドはオーロラキナーゼ A のキナーゼ活性を阻害しなかった。このことから、HLH 構造はペプチド **54** の阻害活性に必須であることが明らかとなった。

結語

本研究では、進化分子工学とペプチド *de novo* 設計を組み合わせた新手法を用い、プロテインキナーゼ結合性ペプチドの獲得を試みた。その結果、標的分子オーロラキナーゼ A 結合性ファージクローンを多数獲得し、キナーゼ阻害活性を持つペプチドを見出した。さらに、HLH 構造はペプチドの阻害活性に必須であることを明らかにした。

審査結果の要旨

近年、自然界における進化の過程、すなわち「多様性」の創出と「選択」を試験管内で再現した進化分子工学が発展を遂げている。代表例であるファージディスプレイ法は、短時間かつ簡便に膨大なサイズのペプチドライブラリーを構築できるので、分子標的ペプチドを検索するための分子ツールとして汎用されている。しかしながら、従来のペプチドライブラリーから得られる分子標的ペプチドはフレキシブルな立体構造を持つため、標的タンパク質結合時の誘導適合 (*induce fit*) によるエントロピー損失が大きく、強い結合活性や高い特異性を確保することが難しい。そこで、本研究では、立体構造を持つペプチドを *de novo* 設計し、これを土台分子と用いた立体構造規制ペプチドライブラリー構築を行った。進化分子工学と、*de novo* 設計人工ペプチドを組み合わせた新手法を用い、プロテインキナーゼ結合性ペプチドの獲得を検討した。

立体構造規制ペプチドとしてヘリックス-ループ-ヘリックス構造をもつペプチドを設計し、ループ領域にランダム変異を導入してライブラリーを構築することを計画した。まず、ループ領域の立体構造を評価した。その結果、ループ領域は、両端が 2 つのヘリックスにより空間的に固定されているため、制限されたコンフォメーションを持つことが判明した。そこで、ランダム変異を導入し、ファージ表層提示ペプチドライブラリーを構築した。このライブ

ラリーをプロテインキナーゼの1種である Aurora-A を分子標的タンパク質としてスクリーニングし、キナーゼ阻害活性を持つペプチドを見出した。得られたペプチドを固相合成して、立体構造と阻害活性との相関を検討したところ、ヘリックス-ループ-ヘリックス構造がペプチドの阻害活性に必須であることを確認した。

以上のように、申請者は、進化分子工学とペプチド *de novo* 設計を組み合わせた新しい分子標的ペプチドの検索手法を開発した。本法は、プロテインキナーゼの分子認識機構を解明するための有用な分子ツールや異常型プロテインキナーゼによる疾患に対する医薬品リード化合物の開発に貢献することが期待される。顕著な新規性と独創性があり、また、本人自身がファージ表層提示ペプチドライブラリーの構築、ペプチド合成、受容体結合実験、酵素阻害実験までのすべてを手がけており、申請者を博士（理学）の学位に値する能力をもつものと判断する。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文の審査ならびに最終試験の結果に基づき、申請者に対して博士（理学）の学位を授与することが適当であると結論した。