

称号及び氏名 博士(理学) 西原 紀夫

学位授与の日付 平成 28 年 6 月 30 日

論 文 名 新規環状 Helix-Loop-Helix ペプチド類縁体の合成および機能評価に関する研究

論文審査委員 主査 藤井 郁雄  
副査 佐藤 孝哉  
副査 円谷 健

## 学位論文要旨

西原 紀夫

### 新規環状 Helix-Loop-Helix ペプチド類縁体の合成 および機能評価に関する研究

生体内の特定の蛋白質に結合しその機能を阻害又は活性化する分子を獲得することは、その蛋白質の生物学的役割を解明する上で極めて重要である。また、その蛋白質の過剰な活性化が特定の疾患と関係することが明らかな場合には、その機能を阻害、抑制する分子はその疾患の治療薬となる可能性を持つ。

生体内蛋白質は、その受容体等の他の蛋白質との相互作用を通じて情報伝達しその機能を発現する場合が多く、その機能を抑制するためには蛋白質-蛋白質相互作用 (PPI) を阻害する必要がある。しかしながら PPI は、いわゆる「鍵と鍵穴」で表現される相互作用とは異なり、蛋白質分子の外部に露出した広い表面積を介した相互作用であるため、経口医薬品で一般的な分子量 500 以下の低分子化合物で阻害することが困難とされている。そこで抗体医薬の開発が進められ、臨床応用されてきた。しかしながら抗体医薬においても、その標的分子が細胞膜表面又は細胞外に存在する蛋白質に限られること、製造プロセスが複雑で薬価が高い等の課題が指摘されている。

大阪府立大学理学系研究科生命化学研究室では、立体構造が規制されたヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) ペプチドを *de novo* デザインし、これを scaffold としたバクテリオファージ、酵母表面提示ライブラリーを作製した。さらに、このライブラリーを用いたスクリーニングにより標的蛋白質に特異的に結合するペプチドの創製に成功してきた。高度に立体規制された環状 HLH ペプチドは抗体に比べて大幅に低分子化されており、また蛋白質分解酵素に対する抵抗性が高いことから次世代の抗体様分子として期待される。

一方、約 40 残基からなる長鎖ペプチドの化学合成では、アミノ酸欠損体等の構造類似の副生成物を多数与え、生物学的機能評価に必要な高純度のペプチドを十分量確保することが困難な場合がある。従って、環状 HLH ペプチドの立体構造を保持し、必要量のサンプルをより確実に取得することができる新たなペプチド類縁体を創製できれば、その機能評価を迅速に行う上で利点大きい。また、そのペプチド類縁体を別の分子で修飾し機能化できれば、研究ツールや医薬品候補分子としての利用価値が大きく広がることになる。

以上のことから、本研究では環状 HLH ペプチドの立体構造を保持した新たな環状ペプチド類縁体の設計を行い、その合成法を確立した。また、この環状ペプチド類縁体を scaffold とした標的蛋白質結合性分子の合成及び機能評価を行い、その有用性について検証した。

## 学位論文審査結果の要旨

平成 28 年 6 月 21 日

学位論文草稿提出者氏名：西原 紀夫

学位論文草稿題目： 新規環状 Helix-Loop-Helix ペプチド類縁体の合成  
および機能評価に関する研究

生体内の蛋白質-蛋白質相互作用 (PPI) を阻害あるいは活性化する分子を獲得することは、その蛋白質の生物学的役割を解明する上で極めて重要である。また、その蛋白質の過剰な活性化が特定の疾患と関係することが明らかな場合には、その機能を阻害・抑制する分子は治療薬となる可能性を持つ。特に、PPI には蛋白質の代表的な 2 次構造である  $\alpha$ -ヘリックス構造を介した相互作用が数多く知られており、その相互作用を阻害するために、安定なヘリックス構造を持つペプチドやそれを模倣した低分子を用いた阻害剤の開発研究が行われている。そこで、申請者は強固な  $\alpha$ -ヘリックス構造をもつ環状ヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) ペプチドを設計し、その効率的合成を開発した。さらに、合成した HLH ペプチドの機能評価を行い、その有用性について検証した。この環状 HLH ペプチドは、抗体に比べて大幅に低分子化されており、また蛋白質分解酵素に対する抵抗性が高いことから次世代の抗体様分子として期待される。

第 1 章では、click chemistry と分子内 bis(thioether) 結合反応を用いた新規環状 HLH ペプチド類縁体の合成法を開発した。40 残基のペプチドを 2 つのフラグメントに分割し、それらを連結することにより直鎖ペプチドを合成し、低分子リンカーを用いて N 末端と C 末端のアミノ酸を結合させることにより環状化を行う方法である。フラグメントの連結法としては、ペプチドや核酸等の多官能性分子の修飾で多用されている click reaction (CuAAC 反応) を用いることとした。また、環状化には反応性の高い Cys 残基のチオール基を介した、分子内ビス(チオエーテル)結合反応を利用することを検討した。

第 2 章では、癌抑制蛋白質 p53 とその抑制蛋白質 HDM2 の相互作用を阻害する環状 HLH ペプチド類縁体を設計し合成した。さらに、蛍光ラベル化することにより、本状 HLH ペプチドの細胞内移行性を確認するとともに、がん細胞の増殖阻害実験を行い、生物活性を評価した。

以上のように、申請者は、この環状ペプチド類縁体が、ヘリックス構造を介した PPI 阻害剤を設計する上で、有用な土台分子となることを示した。さまざまな化学修飾で機能化した環状 HLH ペプチド類縁体が、*in vivo* での血中半減期の改善や、抗体医薬では困難な細胞内での機能発現を可能にしたことから、PPI を阻害する新たな医薬品分子としての可能性を示すことに成功した。本研究は顕著な新規性と独創性があり、また本人自身がペプチド合成、結合活性、生物活性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。