

論文の内容の要旨

論文題目	2段階進化による標的蛋白質結合性ペプチドの新規分子モダリティー開発
学位申請者	望月 和人

現在の医薬品の主流である低分子薬および高分子抗体医薬に代わる分子形態（モダリティー）としてペプチド性中分子医薬が注目されており、 10^8 種類以上の構造多様性を持つペプチド混合物（大規模ライブラリー）の中から疾患関連蛋白質に結合するペプチドを濃縮選択（セレクション）する手法が広く用いられている。ペプチドは20種類の天然型アミノ酸（単量体）の組み合わせからなる重合体であるが、天然型構造だけでは賄えない物性を持つ中分子医薬を取得するため、近年において非天然型構造を併せ持つペプチドライブラリー構築手法が複数提案されている。その中でも拡張ファージディスプレイ法は、ファージディスプレイ法で構築されたペプチドライブラリーに対して非天然構造を持つ分子を化学修飾することで、低コスト・簡便・迅速に非天然型ペプチドライブラリーを構築する手法としてセレクションに利用されている。

本研究では、ファージディスプレイ法を用いた従来型のセレクションを行うことで得られたペプチドに対して「化学的変異」を導入することで、一般的な遺伝子工学的変異の導入だけでは成し得ない大幅なモダリティー変化を伴った非天然型ペプチドライブラリーを作製した。この二次ライブラリーを用いて2段階目のセレクションを行うことで、抗体医薬に匹敵する標的結合力を持つ非天然型ペプチドの取得を試みた。具体的な一例として、人工二環状（クリプタン）型モダリティーを持つ二次ライブラリーの中から、癌関連蛋白質 Heat Shock Protein 90（HSP90）に結合し機能阻害する非天然型ペプチドの取得を試みた。クリプタン型モダリティーは分子運動が制限されることで結合に伴うエントロピーロスを低減すると同時に、エーテル酸素を介した水素結合形成を潜在的に可能にするため、標的に対して強い結合力を持つことが期待できる。

セレクションにより取得されたクリプタン型ペプチドは抗体並みの結合力（解離定数 $K_D = 62 \pm 10$ nM）でHSP90-N末端ドメインへ結合することが明らかとなった。更に、詳細な結合位置や結合様式を実験/計算の両方から解析した結果、クリプタン型ペプチドは既存HSP90阻害剤の結合位置とは異なる位置に対して結合するにも関わらず、HSP90の機能を阻害することを明らかにした。

実験的手法によるクリプタン型モダリティーの実証に加え、独自に作成したデータ科学的手法を併用して、なぜ同モダリティーを用いたときに強い結合体を得られたかを解析した。具体的には、ペプチドライブラリーへの化学的変異導入による幾何学的影響を検証するため、実験で用いた天然型及び非天然型ペプチドライブラリーの一部を仮想ライブラリーとして計算機上に再現し、ケミカルスペース（化合物群を全体として捉えたときの大枠での分子形状）を比較した。クリプタン型ライブラリーは、天然型ライブラリーとは異なるディスク～ロッド型の分子形状を持つことが示唆され、その分子形状がHSP90結合位置の形状と適合することで強い結合力を達成したと考えられる。

本研究で実施したクリプタン型モダリティーの実証及びデータ科学的手法による解析を通して、標的蛋白質の標的部位に適合するモダリティーをあらかじめ半合理的に設計可能である可能性が示された。将来的には導入する非天然構造と得られる分子形状の相関を明らかにし、標的蛋白質の結合部位を自由に狙うことができるペプチド性中分子創薬基盤の確立を目指す。

論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名	望月 和人
審査委員主査	瀧 真清
委員	平野 誉
委員	石田 尚行
委員	白川 英樹
委員	星野 太佑

第1章では、分子標的薬の分子形態（モダリティー）分類やペプチド合成の歴史をまとめ上げたのち、進化分子工学的手法とファージ上での化学修飾（10BASE_d-T）法とを組み合わせることで、新規モダリティー開発手法としての2段階進化を提案するに至った経緯を述べた。

第2章では、モデル蛋白質であるストレプトアビジンに強く結合する新規分子モダリティーの開発を目的として2段階進化を実施したことを記載した。具体的には、先行研究において得られたファージディスプレイ由来の3種類のストレプトアビジン結合ペプチドモチーフを1段階目の淘汰の結果とみなし、これらのペプチド誘導体をファージ上に提示させたペプチドライブラリーに対して化学修飾することで得られる π 型ペプチドライブラリーを構築した。このライブラリーを用いてストレプトアビジンに対する淘汰を行い、標的蛋白質に結合する π 型モダリティーを持つペプチドを同定した。

第3章では、癌関連蛋白質Heat Shock Protein 90（HSP90）に強く結合する新規分子モダリティーの開発を目的として2段階進化を実施したことを記載した。具体的には、先行研究において獲得されたHSP90に結合するクラウンエーテル型ペプチドを1段階目の淘汰の結果とみなし、ファージ上に提示させたペプチドライブラリーに対してジアザクラウンエーテルを化学修飾することで得られるクリプタン型ペプチドライブラリーを構築した。このライブラリーを用いてHSP90に対する淘汰を行い、標的蛋白質に結合するクリプタン型モダリティーを持つペプチドを同定した。同定されたクリプタン型ペプチドは、抗体並みの結合力（解離定数 $K_D = 62 \pm 10$ nM）を持つことを明らかにした。この強い結合力は(1)クリプタン型ペプチドが適度な固さを持つためHSP90との結合に伴うエントロピー損失を低減したこと、および(2)ジアザクラウンエーテル部分がペプチド部分の立体構造を制御することで、クリプタン型ペプチド分子全体としてHSP90との相互作用に適した水素結合等を形成したと考察した。更にクリプタン型

ペプチドは、多くの既存HSP90阻害剤が結合するHSP90-N末端ドメイン(NTD)内のATP結合部位ではなくその外側に位置するに β シート部分に結合することが蛍光偏向度測定や質量分析などから実証され、*in vitro* (試験管内)での変性蛋白質巻き戻り実験の結果からHSP90のシャペロン機能を阻害することが示された。以上の実験結果は、共同研究として実施した長時間分子動力学計算に基づいたドッキングシミュレーションの結果とも一致した。

第4章では、2段階進化における化学修飾がライブラリーに与える影響を検証するため、通常のペプチドライブラリー、化学修飾されたペプチドライブラリー(クラウンエーテル型およびクリプタン型)のそれぞれに関する分子形状に着目したケミカルスペース評価について、データサイエンス的手法を用いて網羅的に*in silico*で解析し、様々な記述子ごとに分類して有意な差が認められる項目を抽出した。その結果、通常のペプチドライブラリーと化学修飾されたペプチドライブラリーとの間には、化合物群を全体として捉えたときの大枠での分子形状に顕著な違いがあることが示された。3章で示されたHSP90-NTDに対するクリプタン型ペプチドの高い結合力の要因の1つとして、標的蛋白質であるHSP90の β シート付近の形状に対して、クリプタン型ペプチドが持つディスク〜ロッド形状が適合したことが挙げられる。

第5章では、本研究の総括を行った。10BASE_d-Tを基幹技術として2段階進化を実施することで、標的蛋白質に強く結合する新規分子モダリティーが獲得可能であることを結論づけた。将来展望として、非天然構造を含むペプチドライブラリー構築とケミカルスペースの評価を組み合わせることで、標的蛋白質の標的部位に適合する分子モダリティーを半合理的に設計/取得することが可能になるであろうことを記載した。

上記内容の主要部分は、英国王立化学会・*Org. Biomol. Chem.*誌(IF=3.88)のfront-cover articleとして採択されており、基礎学術(工学)的発見が豊富に含まれていることが明白である。また本学位論文は、実験とデータサイエンス的手法とを組み合わせることで、非天然ペプチドライブラリーの質(=ケミカルスペース)を評価した初めてのものであり、将来的には化学修飾分子の構造を変化させるだけで、多様な標的蛋白質に対応する結合体(=分子標的薬候補化合物)を自在かつ簡便に取得しうることに繋がる。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な価値を有するものと認める。