

氏名	望月 佑樹
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第 940 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	架橋構造を有する分子認識ペプチドの試験管内淘汰に関する研究
論文審査委員	委員長 准教授 根本 直人 委員 名誉教授 伏見 譲 委員 教授 中井 淳一 委員 教授 西垣 功一 委員 准教授 大倉 正道

論文の内容の要旨

近年、化学合成・化学修飾が容易であり様々な分子/材料に対して親和性を有するペプチドは抗体に代わる分子認識分子として基礎生物学研究、材料科学、医診断療等幅広い分野で応用されている。ペプチドの標的分子の多様性に関する研究の一方で、親和性を向上させるアプローチとして架橋構造を有した分子認識ペプチドが盛んに研究されている。しかし、従来の架橋構造含有ペプチドの大多数はタンパク質を標的分子としており、タンパク質以外の分子/材料等に対する分子認識能の研究は皆無であった。また、天然には、例えば複数のジスルフィド架橋により構造が安定化され、標的分子に対して極めて高い親和性・選択性を示すコノトキシンのようなジスルフィド架橋含有ペプチドが多数存在している。しかし、これまでコノトキシンのような複数のジスルフィド架橋を有するペプチドを試験管内淘汰により *de novo* デザインした例はない。そこで本研究では、ジスルフィド架橋含有ペプチドにも対応した進化工学技術である cDNA ディスプレイ法を精緻化した改良を経て、未開拓である非タンパク質分子/材料を認識するジスルフィド架橋含有ペプチドの試験管内淘汰による創製に取組んだ。

本論文では、まず初めにジスルフィド架橋含有ペプチドの効率的な創製のために cDNA ディスプレイ技術による分子進化システムの改良を行った。cDNA ディスプレイ分子は無細胞翻訳系を用いて翻訳されたタンパク質とそれをコードした cDNA がピューロマイシン・リンカーを介して共有結合により連結した分子である。本技術では翻訳後反応（ジスルフィド架橋の形成等）を固相上で可能とする点が他の類似技術に比べ優位な技術的長所となっている。しかし、cDNA ディスプレイ分子の最終収率は 1%前後と効率が悪いという課題があった。そこで、cDNA ディスプレイ分子の前駆体に相当する mRNA-タンパク質連結体の固相化ステップの最適化を行い、収率を従来の約 17 倍に改善した。また、試験管内淘汰実験により取得した配列（特にジスルフィド架橋含有ペプチド）の一次機能評価を迅速簡便に行うために、ピューロマイシン・リンカー技術と無細胞翻訳技術を組み合わせた簡易なプルダウンアッセイ法を開発した。これらの成果により、分子認識ペプチド（特にジスルフィド架橋含有ペプチド）の取得及び評価の両面で有効な cDNA ディスプレイ法による分子進化システムを構築した。

以上の成果を踏まえて、ジスルフィド架橋含有ペプチドライブラリからの官能基認識ペプチドの取得を試みた。本研究では 30 アミノ酸からなるシステインの出現頻度を高めたランダムペプチドライブラリを使用し、固相上に提示されたアミノ基 (NH₂) に対して試験管内淘汰実験を行った。

その結果、ジスルフィド架橋を二組有するアミノ基認識ペプチドが取得された。分子認識能を有するジスルフィド架橋パターンを明らかにするために、異なるジスルフィド架橋の組合せを有する 3 種類のペプチドをそれぞれ化学合成し結合評価を行った。その結果、Cys3-Cys11、Cys25-Cys28 にてジスルフィド架橋を組んでいるペプチド (CP1 (2SS)- α) のみがアミノ基と相互作用することが判明した。さらに、多様な固相表面 (磁性体ビーズ、ガラス、アガロース) 上に提示されているアミノ基に対して結合評価を行うことで認識分子がアミノ基であることを確認した。また、各ジスルフィド架橋を Ser に置換したペプチドと、N 末端側および C 末端側の各ループ領域のペプチドの結合評価をしたところ、アミノ基への相互作用は確認されなかった。これらの結果は、CP1 (2SS)- α が単なる環状ペプチドによる相互作用ではなく、二組のジスルフィド架橋による両ループ構造とその間の連結配列が相互作用に必須であることを示している。さらに円二色性測定を行ったところ、変異体配列群と比較し CP1 (2SS) - α 特有のスペクトルが得られ二組のジスルフィド架橋が二次構造形成に影響していることが判明した。

これらの結果より、ジスルフィド架橋が機能に密接に関係するアミノ基結合ペプチドが取得できたと考えられる。本研究で創出された CP1 (2SS)- α は 1st Cys-2nd Cys、3rd Cys-4th Cys というジスルフィド架橋パターンを有している最初の機能ペプチドの例である。さらに、従来では予想されなかった官能基 (アミノ基) という極めて小さな分子を 30 残基程度のペプチドにより分子識別可能であることを示した最初の例でもある。これらの結果は、多様な架橋パターンによりペプチドの分子識別機能が拡張可能であることを示唆するものである。また、本研究により、ジスルフィド架橋含有機能ペプチドの淘汰・進化における改良型 cDNA ディスプレイ法による分子進化システムの技術的有用性を実証できたと考えている。

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 26 年 1 月 31 日（金）に工学部機能材料工学科棟会議室にて公開で開催した。審査結果を以下に要約する。

本学位論文は、ジスルフィド架橋を有するペプチドの創出に有効な cDNA ディスプレイ法の改良による分子進化システムの構築とそれを応用したアミノ基認識ペプチド創出に関するものである。

本研究では、ジスルフィド架橋含有ペプチドの効率的な創製のために cDNA ディスプレイ技術の改良による分子進化システムの構築を行っている。cDNA ディスプレイ分子は無細胞翻訳系を用いて翻訳されたタンパク質とそれをコードした cDNA がピュロマイシン・リンカーを介して共有結合により連結した分子である。本技術は調製の段階で翻訳後反応（ジスルフィド架橋の形成等）を固相上で行うことが可能であり、このことが他の類似技術に比べ優位な技術的長所となっている。しかし、cDNA ディスプレイの最終収率は 1%前後と効率が悪いという課題があった。そこで、cDNA ディスプレイの前駆体に相当する mRNA-タンパク質連結体の固相化ステップの最適化を行い、収率を従来約 17 倍に改善しこの課題を解消した。また、試験管内淘汰実験により取得した配列（特にジスルフィド架橋含有ペプチド）の一次機能評価を迅速簡便に行うために、ピュロマイシン・リンカー技術と無細胞翻訳技術を組み合わせた簡易なプルダウン法を開発した。これらの成果により、分子認識ペプチド（特にジスルフィド架橋含有ペプチド）の取得及び評価の両面で有効な cDNA ディスプレイによる分子進化システムを構築した。

以上の成果を踏まえて、ジスルフィド架橋含有ペプチドライブラリから、従来、報告例がない官能基認識ペプチドの取得を試みている。本研究では 30 アミノ酸からなるシステインの出現頻度を高めたランダムペプチドライブラリを使用し、固相上に提示されたアミノ基 (NH_2) に対して試験管内淘汰実験を行っている。その結果、ジスルフィド架橋を二組有するアミノ基結合ペプチドが取得された。ジスルフィド架橋の組合せを解析したところ、Cys3-Cys11、Cys25-Cys28 にて架橋しているペプチド (CP1(2SS)- α) がアミノ基に相互作用することが判明した。さらに、多様な固相表面（磁性体ビーズ、ガラス、アガロース）上に提示されているアミノ基に対して結合評価を行うことで認識分子がアミノ基であることを確認した。さらに、N 末端側および C 末端側の各ループ領域の断片化ペプチドと各ジスルフィド架橋を Ser 置換により直鎖状にした変異体ペプチドがアミノ基に相互作用しないことから、CP1(2SS)- α の二組のジスルフィド架橋による両ループ構造とその間の連結配列全体が相互作用に必須であることを確かめている。最後に、円二色性測定を行うことで CP1(2SS)- α が特有の二次構造を有していることがわかり、二組のジスルフィド架橋が二次構造形成に影響を与え、結果としてアミノ基の認識という機能創出に生み出すことが推測された。

本研究で創出された CP1(2SS)- α は 1st Cys-2nd Cys、3rd Cys-4th Cys という特徴的なジスルフィド架橋パターンを有している最初の機能ペプチドの例である。さらに、従来では予想されなかった官能基（アミノ基）という極めて小さな分子を 30 残基程度のペプチドにより分子識別可能であることを示した最初の例ともなっている。このことは、多様な架橋パターンによりペプチドの分子識別機能が拡張可能であることを示唆しており、ペプチド科学に新たな知見を加えた画期的な成果といえる。また、複数のジスルフィド架橋を有する機能ペプチドを淘汰・進化する上で cDNA ディスプレイ法の技術的有用性を実証することにもなり、本技術の今後の応用展開をさらに期待させる研究成果である。

以上の成果は、第一著者として2編の論文に既にまとめられ査読付きジャーナル (*ACS Comb Sci, Anal Biochem*) にて発表され、さらに第一著者として一編の論文を投稿中である (*Chemical Communications*. 2014年3月31日受理)。以上のことから、本論文は博士の学位論文として十分な内容であると判断し、「合格」とした。