

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 13126 号
------	---------------

氏 名 小崎 一功

論文題目

細胞内で機能するペプチドの探索法に関する研究
(Study on the screening system of intracellular functionable peptides)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	清中 茂樹
委員	名古屋大学	教授	村上 裕
委員	名古屋大学	教授	中野 秀雄
委員	名古屋大学	准教授	清水 一憲

論文審査の結果の要旨

小崎一功君提出の論文「細胞内で機能するペプチドの探索法に関する研究」は、低コストで生産可能であるという低分子医薬品と、標的タンパク質との親和性が高く、副作用が少なく薬効が高いという抗体医薬品の利点を併せ持つ医薬品候補として注目されているペプチド医薬品の開発を視野に、新薬のリード化合物になりうる細胞内で機能するペプチドを効率よく探索する技術の開発を目指し、これまで当研究室で構築したペプチドの細胞内送達系を基盤とする新たなペプチド探索手法の構築を試みた。本論文は、背景を記述した第1章に引き続き、実際に細胞透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide; CPP) を結合させた機能性ペプチドの細胞内機能評価を行い、一残基置換ペプチドライブラリーにおける活性の違いを明らかにした第2章、CPPと機能性ペプチドが細胞内で解離するシステムを組み込んだ評価系を開発し、細胞内で機能性ペプチドのみの活性を評価できることを明らかにした第3章、および本論文の総括を与える第4章の合計4章から構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章では、ペプチド医薬品の現状を実例を交えて記述し、ペプチドアレイによるスクリーニング技術の現状と問題点、細胞内透過性ペプチド (CPP) の活用例、および細胞内機能性ペプチドの探索法など、本論文の研究背景について詳細に記述している。

第2章では、今回構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、実際にペプチドの細胞内機能評価が可能か、ペプチド配列の最適化に応用可能かを検証した。既報の細胞死誘導ペプチド (LNLISKLF) を用い、CPP-機能性ペプチド複合体が高い細胞死活性を示すことを確認し、アラニンスキャンによるアミノ酸置換部位の絞り込みと絞り込んだ部位の網羅的なアミノ酸置換を行い、元の配列と比較して細胞死活性が2倍から4倍高いペプチドの取得に成功した。また、ペプチド活性の向上したアミノ酸置換を考察し、親水性の高いアミノ酸であるSから疎水性の高いアミノ酸 (F, V) や芳香環をもつアミノ酸 (F, W, Y) への置換が活性向上をもたらすという特徴を確認した。さらに、カルシウムイメージングにより、取得した高活性ペプチドは元のペプチドと同様の作用機序で細胞死を引き起こすことが示唆された。以上の結果より、本論文で構築したペプチドの細胞内送達系は多種類のペプチドの細胞内機能評価を簡便に行うことが可能であり、ペプチドの最適化に有用な技術であることが示された。

第3章では、CPPの影響を排除した細胞内で機能するペプチドの探索系の構築を試みた。ペプチドアレイ技術を用いて、CPPと機能性ペプチドをジスルフィドで架橋する新規合成法を考案し、実際に目的のヘテロ二量体ペプチドの合成が可能か、細胞内でCPPが解離するシステムを組み込んだ系を用いてペプチド探索が可能かを検証した。分岐鎖ペプチド合成技術を用いることで、CPPと機能性ペプチドを一つの分子内に合成することで、ジスルフィド架橋が分子内反応となるように設計した。質量分析によって、目的のヘテロ二量体ペプチドが選択的に合成されることが確認できた。また、還元剤を用いた処理及び細胞内のGSH濃度を模倣した還元環境でCPPが解離し、細胞内でペプチド本来の機能が評価できることが示唆された。また、細胞死を引き起こすペプチド (WELVVLGKL) をモデルとし、実際に活性を評価可能か、ペプチドの探索が可能かを検証した。合成したヘテロ二量体ペプチドの細胞内機能評価に成功した。また、細胞死誘導ペプチドの1残基置換を行い、合計162種類のペプチドの細胞死活性を評価した。その結果、元ペプチドと比較して統計的に有意に活性の高いペプチドを6種同定することに成功した。以上の結果より、ペプチドの細胞内送達系をベースにジスルフィド架橋による細胞内切断システムを組み込んだ本系は、CPPの影響なくペプチド本来の機能を評価できる探索系であり、細胞内を標的とするペプチド医薬品開発に貢献できる技術であることが明らかになった。

第4章では、本研究の総括を与えている。

以上のように、本論文ではペプチド医薬品開発につながる細胞内で機能するペプチドを探索するための方法に関して述べた。今回構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、ペプチドの細胞内評価とペプチド配列の最適化が可能で、CPP付加の課題を解決するような系の改良を実証し、細胞内で機能するペプチドを効率よく探索できる新規手法の構築に成功した。本探索方法を用いることで、細胞内で機能するペプチドの機能評価ならびに高活性な機能性ペプチドの同定、重要なアミノ酸残基の同定や活性をもたらすペプチドの特徴を評価することが可能であり、工学の発展に寄与するところが極めて大きい。よって、本論文の提出者である小崎一功君は博士 (工学) の学位を受けるに十分な資格があると判断した。