

# 学位論文の要旨

氏名

坂元 孝太郎

学位論文題目

タンパク質の機能を模倣する小分子ペプチドの設計研究

標的分子に対して高い特異性と親和性を持った小分子を自在に創製することができれば、バイオテクノロジーを始めとする様々な分野に極めて大きなインパクトを与えることができる。本論文は、そのような小分子をペプチドで実現するための、ファージディスプレイ技術を用いた戦略的かつ容易な分子設計方法の基礎研究と、その結果を用いて実際に設計されたペプチドの応用例について述べたものである。本論文は、以下の5章から成っている。

第1章では、本論文の序論を示した。タンパク質-タンパク質間の相互作用を代表するような、様々な分子間の反応を制御し得るように設計された小分子は、医薬品をはじめとする多岐にわたる分野に有用である。そのような分子は、一般的には膨大な数の天然物や既存の合成化合物の集団からスクリーニングすることで得られてくる。しかし、目的の活性があるような分子の単離は、偶発的な発見に寄与するところが大きく、決して容易なことではない。ここでは、これまでに上記の点を克服するべく、行われてきた分子設計法の背景と、筆者が検討した新規のアプローチ方法についてまとめた。

第2章では、本研究の要となるペプチドファージライブラリについて示した。バクテリオファージは、大腸菌に感染して増幅するウイルスである。近年このファージを構成するコートタンパク質上に、遺伝子工学的な手法を用いてランダムなペプチド分子を提示させる系が開発された。この手法により、数千万種類以上にも及ぶペプチドの集合体を、ファージを介して得ることが可能となってきた(ペプチドファージライブラリ)。これらのペプチドはファージの表層に発現しているため、標的とする物質と結合可能であることから、様々な分子の結合モチーフの同定に利用されてきている。この章ではファージ

ジディスプレイ法の技術概念と、これを用いて作製した多種類のペプチドファージライブラリ、さらに分子進化工学的な手法による効率的なペプチドファージのスクリーニング方法(バイopanニング法)について示した。

第3章では、筆者が検討してきたスクリーニング手法によって、ヒトのラクトフェリン(LF)に特異的なペプチドを単離し、得られたアミノ酸配列を元にして、ヒトLFの新たな機能について検討した結果を示した。LFは、母乳や好中球の分泌2次顆粒に多く存在する鉄結合性の分泌性糖タンパク質である。抗菌活性や抗炎症、免疫抑制活性、抗ウイルス、抗ガン転移活性など非常に多様な活性を持つため、多機能性タンパク質と呼ばれているが、そのレセプターや作用部位、作用機構は、未だ完全には理解されていない。そこで筆者は、ヒトLFを標的としてランダムペプチドT7ファージライブラリを用いた親和性ペプチドの探索を行い、ヒトLFに結合するペプチド配列から、ヒトLFレセプターの同定を試みた。単離されたヒトLF特異的なペプチドモチーフには、生体内における細胞の接着という極めて重要な要素に直接的な関わりを持つRGD(アルギニン・グリシン・アスパラギン酸)配列が含まれていた。このことは、ヒトLFが、RGD配列を有するタンパク質と相互作用する可能性を示唆しており、ここから筆者はヒトLFに細胞接着阻害という新たな機能が存在すると考えた。RGD配列を有し、細胞接着に関連する代表的な細胞外マトリックスタンパク質;フィブロネクチン(FN)やビトロネクチン(VN)と、ヒトLFとの相互作用を検討した結果、両者は濃度依存的な結合性を示した。さらに、FNを介したCHO、RAW、Hela細胞といった代表的な接着系細胞の接着とヒトLFの関係を評価したところ、ヒトLFは実際に細胞の接着を阻害することが明らかとなった。一方で、リゾチームや類縁タンパク質であるトランスフェリン(TF)などは、このような活性は示さなかった。これらの結果は、LFの新しいレセプターの候補とヒトLFの細胞接着阻害という新しい機能を明らかにしただけではなく、ヒトLFがRGD配列を有するようなタンパク質と結合し、その相互作用を阻害することによって、LFの多機能性が発現されているかも知

れないことを示唆している。

第4章では、同様の手法を用いて、ヒトのイムノグロブリンG(IgG)に特異的なペプチドを単離し、ヒトIgGの精製に応用した結果と、そこから得られたペプチドのヒトIgGに対する結合特性を評価した。ヒトIgGは、免疫系における主要な抗体であり、近年では抗体医薬として使用される極めて重要なタンパク質である。これまで、ヒトIgGの単離・精製には、ヒトIgGに特異的なその他の動物種の抗体や、バクテリア由来のタンパク質であるプロテインA、プロテインGが利用されてきた。しかし、これらは高価である、バクテリア由来のエンドトキシン(毒素)の混入の恐れといったデメリットがあった。そこで筆者は、IgG抗体の検出・精製用のアフィニティリガンド(分子認識素子)として、ペプチドの応用を考え、ヒトIgGの特にFc領域に特異的なペプチドの単離を、ランダムペプチドT7ファージディスプレイライブラリを用いて行った。ヒトCTLA-4/Fcキメラタンパク質に対するスクリーニングを行った結果、明確な相同性を有する6つのモチーフが得られた。これらを提示するファージクローンは、いずれもヒトIgGに特異的な結合を示すが、ヒトIgA, E, M, マウスIgG, A, Eには結合を示さなかった。さらに詳細な結合評価を行ったところ、非常に興味深いことに、筆者のペプチドモチーフは、酸処理による構造的な変性を起こしたヒトIgGにのみ特異的に結合していることが明らかとなった。これまで、酸によって正常とは異なる構造のIgGが誘導されるということは報告されておらず、さらにこのような同一タンパク質中の構造変化を見分けるようなペプチドも極めて興味深いものである。これらの結果から、筆者の単離したペプチドモチーフは、酸変性IgGを除去するシステムの開発(抗体医薬としてのヒトIgGの品質管理)といった面への応用と、構造変化を追跡するセンサーとして応用できる可能性を持っている。

第5章では、以上の結果を総括し、今後の課題および今回得られたペプチド小分子の様々な分野への応用展開について提唱した。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 242 号	氏名	坂元孝太郎
審査委員	主査	伊東祐二	
	副査	杉村和久	隅田泰生

学位論文題目                    タンパク質の機能を模倣する小分子ペプチドの設計研究  
(Molecular Design of Small Peptides Mimicking Protein Function)

### 審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、ファージディスプレイ法によって構築された大規模なランダムペプチドライブラリを用いて、新規の活性ペプチドを創製する手法を開発し、その応用研究として2種のタンパク質、ヒトのラクトフェリン(LF)とヒトの抗体(IgG)に対する特異的ペプチドの単離とその性状解析を行ったものである。本論文は、以下の5章より構成されており、各章の内容は以下の通りである。

第1章では、本論文の序論を示した。タンパク質に特異的に結合し、タンパク質-タンパク質間の相互作用の様な生体分子間の反応を阻害するように設計された小分子は、医薬品をはじめとする多岐にわたる分野に有用である。ここでは、これまでに行われてきた分子設計法の背景と、筆者が検討したアプローチ方法についてまとめた。

第2章では、本研究の要となるファージディスプレイ法の技術概念と、これを用いて作製した多種類のペプチドファージライブラリ、さらに分子進化工学的な手法による効率的なペプチドファージのスクリーニング方法(バイオパンニング法)について示した。

第3章では、筆者が検討してきたスクリーニング手法によって、ヒトLFに特異的なペプチドを単離し、得られたアミノ酸配列を元にして、LFの新たな機能について検討した結果を示した。LFの新しいレセプターの候補とヒトLFの細胞接着阻害という新しい機能を明らかにし、LFの生理学的な多機能性を説明する一つの機構を提案した。

第4章では、同様の手法を用いて、ヒトのIgGに特異的なペプチドを単離し、ヒトIgGの精製に応用した結果と、そこから得られたペプチドのヒトIgGに対する結合特性を示した。この結果、酸によって正常とは異なる構造のIgGが誘導されるということ、さらにこのような同一タンパク質中の構造変化を見分けるようなペプチドを同定した。

第5章では、以上の結果を総括し、今後の課題および今回得られたペプチド小分子の様々な分野への応用展開について提唱した。

以上、本論文は、標的結合活性を有する機能性ペプチドの設計に関する研究で、ヒトLFとヒトIgGに対する結合性ペプチドの単離とその性状解析について検討を行い、多機能性タンパク質として注目されるLFの機能発現に関わる重要な細胞接着阻害能を明らかにし、ヒトIgGの酸処理によって誘導される特殊なコンフォメーションの分子種の同定とそれを特異的に検出、除去できる方法論を提案した。これはペプチドミミックのデザイン研究に大きく寄与する。よって、審査委員会は学位(博士)の学位論文として合格と判定した。

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第 242 号	氏 名	坂元孝太郎
審査委員	主 査	伊東祐二	
	副 査	杉村和久	隅田泰生

最終試験は、以下の要領で博士論文の発表会を行い、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。博士論文の発表会は、平成19年1月29日、14時00分より鹿児島大学工学部共通棟402号室にて行い、30分の博士論文内容の発表後、約30分間の諮問を含む質疑応答が行われた。具体的な質疑応答の内容を、以下に示す。

### 1) 標的分子に対する特異的結合性ファージの単離手法について

質問：LF と IgG という2つの標的に対するパンニングにおいて、標的結合性ファージの濃縮効率が異なるのはなぜか？  
 回答：基本的なパンニング条件は同じであるが、洗浄液に使用する界面活性剤の濃度が異なること、洗浄時間を変えて行っている。これは、目的とするペプチドの標的分子に対する結合力が、標的分子によって異なるため、それぞれの標的に応じた単離条件の設定を行っているためである。LF では弱い相互作用を示すクローンも回収するために、低濃度の界面活性剤を使用し、IgG では解離速度の遅いペプチドモチーフを単離するために、より高濃度の界面活性剤で長時間培養する洗浄方法を行っている。

質問：ペプチドファージライブラリには、CXC型、XCXC型、直鎖型と大きく3種類あるが、どのタイプが良いということは言えるのか？  
 回答：抗原によって最適なライブラリのタイプは異なると考えられる。IgG に対するペプチドでは、結合速度が速く、解離速度の遅いペプチドを設計する必要性があったので、S-S 結合によって構造的に安定な環状型のライブラリを用いた。CXC型から実際に単離が成功し、XCXC型からは濃縮がうまくいかなかったのは、後者の方がシステインの外側に余分に3残基のランダムペプチドを有しているため、配列の多様性をライブラリが十分にカバーされていなかったことが原因ではないかと考えられる。

### 2) IgG 結合性ペプチドと抗体の構造学的、生理学的な観点からの性状について

質問) IgG 結合性ペプチドは、抗原と結合するFab領域でも、FcγR と結合するヒンジ領域近くでもなく、プロテインAが結合する部位であった。この結果は、狙って行ったものなのか？

回答：パンニング操作における抗原は Fc 断片を用いることで、Fabやヒンジ領域に結合するペプチドが単離されないように工夫した。ただ、今回の結果のように、酸によって誘導される特殊な構造を持つ IgG と正常な構造を持つ IgG を区別できるようなペプチドの単離を意図したわけではない。特殊な IgG の存在は、私のペプチドが単離されることで初めて明らかになったものである。

質問：酸による特殊なIgGの構造はどのようなものなのか？生理学的な意義づけは？

回答：立体構造を解析することで、明らかになると考えられるが、現段階では Fc 領域に限って構造変化が起きているという示唆しかできない。X線結晶構造解析、NMR構造解析を含め、今後検討していく必要があると考えている。生理的な機能に関係しているかどうかは現在のところ不明である。

質問：IgGの構造変化に糖鎖は何か関係があるのか？

回答：IgGのFc領域には糖鎖が存在するが、これを除去した抗体に対しても、今回単離したペプチドは反応を示さないことから、糖鎖とIgGの構造変化は直接関連がないものと思っている。ただ、糖鎖の末端から、少しずつ除去した糖鎖を持つ抗体について結合活性がどのように変化するかは、まだ検討していないので、今後、構造変化したIgG分子種を精製することができれば、質量分析などを行うことで、糖鎖の関連は予想できると考えている。

### 3) 医薬品への応用を目的とした、ペプチドの生体内での使用に対する展望について

質問：単離したペプチドを生体内での使用することを想定した工夫というのはあるのか？

回答：今回、単離したペプチドは、LF 結合性ペプチドでは LF 自身の機能解析に応用したものであり、IgG 結合性ペプチドは分子認識素子として工業的に応用することを考えているため、生体内への応用は検討していない。

以上の内容から、3人の審査員は、審査対象者が大学院博士課程修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。