

Title	ペプチド創薬を目的とした新規環化反応の発見とその特性評価
Author(s)	田村, 崇
Citation	
Issue Date	2022-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/17779
Rights	
Description	Supervisor:芳坂 貴弘, 先端科学技術研究科, 博士

氏名	田村 崇		
学位の種類	博士 (マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 541 号		
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 24 日		
論文題目	Development of novel peptide cyclization for peptide drug discovery and evaluation of their properties		
論文審査委員	主査	芳坂 貴弘	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		藤本 健造	同 教授
		松村 和明	同 教授
		山口 拓実	同 准教授
		瀧 真清	電気通信大学 教授

論文の内容の要旨

Until now, drug discovery has focused on two modalities: small molecules (molecular weight ~500) and biologics such as antibody drugs (molecular weight > 5000). Small molecules could act on intracellular disease-causing targets due to their high cell membrane permeability, and they could be administered orally, which has advantages in terms of dosing convenience, but they have low selectivity for binding to targets, and their dosing may be limited due to side effects. Biologics have the advantage of a large molecular structure that allows them to develop specific binding properties and therefore have low side effects. They also have high affinity to extracellular targets and are expected to have long-lasting drug effects.

Recently, drug discovery research on intracellular protein-protein interactions (PPIs) has been expected to be one of the next generation of breakthrough drugs. However, intracellular PPIs targets cannot be targeted by small molecule drugs or biologics such as antibodies. In this thesis, I report on the development of a technology to search for drug-like peptides for targeting intracellular PPIs.

Cyclic peptides are expected to have both good metabolic stability and affinity for therapeutic target protein surfaces. In addition, cyclic peptides have been shown to be permeable to cell membranes in only a few cases, such as cyclosporin A (CSA). However, there is no universal method for developing peptides to be permeable to cell membranes. In order to do that, there is a need for a potent peptide library with high cell membrane permeability that are useful for intracellular PPIs as drug discovery target.

Therefore, I set a goal to search for new peptide cyclization reactions and to develop technologies that can construct cell membrane-permeable peptide libraries. I expect that the solution of this research problem will contribute to the proposal of universal peptide molecular design with cell membrane permeability and the development of peptide libraries targeting intracellular PPIs.

In Chapter 2, I described the development of a new peptide cyclization method with a ring structure in the main chain of cyclic peptides. The concept of the cyclization reaction is based on the synthetic method of Luciferin, in which a Cys residue is placed at the N-terminus and a non-natural amino acid with a cyano group on the side chain is placed at the C-terminus, resulting in the spontaneous formation of a thiazoline ring. The control

of the cyclization reaction rate and the diversity of amino acid sequences of peptides that can be adapted to the cyclization reaction were also examined.

In Chapter 3, I described the PAMPA model membrane permeability of thiazoline ring-bridged cyclic peptides. The characteristics of thiazoline ring-bridged cyclic peptides were compared with those of thioether- and amide-bridged cyclic peptides. In order to analyze the membrane permeability factors, the effect of changing the amino acid sequence and hydrophobicity on the membrane permeability and the solution structure were analyzed using NMR.

In Chapter 4, I described adaptation of the thiazoline ring-bridged cyclization to cell-free translation systems based on the fact that the cyclization reaction proceeds in aqueous solution. To confirm that the reaction proceeds in a variety of peptide sequences, I examined the effect of the length of the amino acid sequence and the presence of Cys in the chain other than the N terminus on the cyclization reaction.

Key Word

Thiazoline ring-bridged cyclic peptides, Cell membrane permeability, Cell free translation, Peptide drugs, Intracellular protein-protein interactions (PPIs)

論文審査の結果の要旨

中分子環状ペプチドは、抗体医薬の分子認識能と低分子医薬の細胞膜透過性を併せ持つ医薬品として注目されている。本論文では、高い細胞膜透過性を持ちうる新たな環化構造を有する環状ペプチドの合成とその膜透過性を評価することを目的として研究が進められた。

まず、ホタルの発光物質であるルシフェリンの生合成経路から、シアノ基を有する非天然アミノ酸と N 末端システインとの間でチアゾリン骨格を形成するペプチド環化反応を着想し、化学合成法によりその反応が検証された。その結果、シアノチオフエンなどを有する非天然アミノ酸において、室温・中性水溶液中で効率良くかつ速やかに環化反応が進行することが見いだされた。またその反応性はシアノ基の電荷密度に依存し、LUMO 軌道のエネルギー準位と相関することも示された。

続いて、得られた環化ペプチドのモデル膜に対する膜透過性が評価された。同様のアミノ酸配列を有するアミド結合およびチオエーテル結合による環化ペプチドと比較したところ、チアゾリン環化ペプチドは分子の疎水性の増加に応じて膜透過性が向上することが見いだされた。この高い膜透過性は、分子内水素結合の形成とそれに伴う溶媒暴露表面積の低下、および疎水的なチアゾリン環による他の極性基の遮蔽によるものであることが、温度可変 NMR と分子動力学計算により示された。

一方、標的分子に結合する環状ペプチドを取得する上で、無細胞翻訳系を利用した分子選択技術へ適用可能とする必要がある。そこで、無細胞翻訳系におけるシアノ基を有する非天然アミノ酸を導入したペプチドの発現とペプチド環化反応についても検証された。その結果、それらの非天然アミノ酸がペプチドに導入され環化反応が進行することが確認され、特にシアノチオフエンを有する非天然アミノ酸が適していることが示された。また、ペプチド鎖中にシステインが存在する場合も含めて、アミノ酸配列と長さの異なる環状ペプチドの合成にも適用できることが実証された。

これらの成果は、任意の標的分子に対する結合性と細胞膜透過性を併せ持つ環状ペプチドを取得するための基盤技術となるものであり、今後、細胞内でのタンパク質間相互作用に作用するペプチド医薬の

開発などに活用されると期待される。

以上、本論文は、ペプチド医薬の開発に向けて新たな環状ペプチドの合成法を確立し、その特性を明らかにしたものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。