

氏名	鎌田 祐輔		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 9051 号		
学位授与年月日	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Biophysical Studies on Protein—Protein Interactions in Drug Discovery (薬物探索におけるタンパク質間相互作用に対する生物物理学的研究)		
主査	筑波大学准教授	博士 (理学)	丹羽 隆介
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人

## 論 文 の 要 旨

本論文は、タンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction : PPI) をターゲットとした創薬に関する研究成果を記したものである。

現在、創薬研究の化合物探索手法としては、低分子化合物ライブラリーを利用したハイスループットスクリーニング (HTS) と呼ばれる生化学的アッセイが一般的である。この手法は、化合物が作用しやすい小さなポケットを有する酵素や受容体を創薬ターゲットとする場合には有効性を発揮してきた。しかし一方で、HTSによって効率的に阻害剤を同定することができる創薬ターゲットは飽和しつつあり、旧来の手法での創薬開発は限界を迎えてきている現状がある。

このような中で、PPIを新たな創薬ターゲットとすることによって効果を発揮する薬剤、すなわちPPI阻害薬の探索が注目されている。PPI阻害薬は、タンパク質表面に存在するPPIに必要な「ホットスポット」に高い親和性を持って作用することが求められる。このような化合物の探索には、化合物の結合活性を指標とした感度および精度の高い生物物理学の実験方法が必要である。しかし、既存の生物物理学的手法と従来のHTS用化合物ライブラリーを組み合わせた手法は現在まで十分な有効性を発揮しているとは言いがたく、様々な面での技術的改善が求められる。

そこで本論文で著者は、汎用の低分化合物ライブラリーとは異なるライブラリー群と生物物理学の実験手法を組み合わせ、PPIの性質に応じた化合物探索、および分子間相互作用解析を行い、化合物探索とその相互作用メカニズムを解明することを目指した。

第1章で著者は、がんや炎症性疾患に関与するタンパク質であるBCL6とBcoRのPPI阻害薬の探索を報告している。BCL6-BCOR間相互作用は、これらのタンパク質複合体の生理活性において極めて重要である。よって、相互作用阻害は創薬ターゲットとして関心が持たれてきたが、既報のHTSの結果では低親和性の化合物のみしか同定されていなかった。そのような中で著者は、従来のHTS用化合物をさらに小さくフラグメント化した化合物ライブラリーを用いることによって、BCL6-BcoRの相互作用に必要なホットスポットに作用するPPI阻害薬の探索を提案した。実験の結果、著者は、BcoR結合化合物の同定に成功し、さらに取得された化合物はホットスポットと示唆できるサイトに $10^{-8}$  Mオーダーの親和性で結合することを明らかにした。また、構造生物学的解析から、この化合物がBCL6-BcoRの結合面に作用し、PPI阻害薬として作用することを実証した。

第2章で著者は、フェージディスプレイライブラリー、すなわち数~十数のアミノ酸残基からなるペプチド化合物ライブラリーを用いた、がんに関与するタンパク質であるKRASとSOS1のPPI阻害薬の同定を報告している。KRAS-SOS1間相互作用の阻害薬は、フラグメントライブラリーを用いた先行研究によって同定されてはいるものの、活性増強に進展がないのが現状であった。そこで本論文で著者は、直鎖ならびに環状ペプチドを提示するT7フェージを用いたフェージディスプレイライブラリーを用いて、新たに活性化型KRASであるKRAS (G12D) に結合する化合物を探索した。その結果、直鎖ペプチドは取得されなかったが、1つの環状ペプチドが取得された。得られた環状ペプチドは、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析により、 $10^{-8}$  Mオーダーの親和性を示すこと、SOS1拮抗作用を有すること、そしてKRAS (G12D) およびGDP結合型KRASに対する選択性を有することが明らかとなった。また、複合体構造解析により、環状ペプチドはKRASのアロステリックサイトに結合することが明らかとなった。さらに著者は、取得ペプチドの両末端にアルギニンを付与することで細胞透過性を高めた環状ペプチドを用いて、細胞評価においてもこの環状ペプチドがKRAS (G12D) に対する阻害活性を有することを確かめた。

## 審 査 の 要 旨

本研究によって著者は、2つのPPIに注目し、生物物理学的実験による結合を指標とした化合物探索法によって、細胞評価においても活性を有する化合物を見出すことに成功した。この一連の研究は、フラグメントライブラリーやフェージディスプレイライブラリーと生物物理学的手法を組み合わせることが、PPI阻害薬探索に有効であることを示す点で非常に意義深い。また、得られた化合物が、明瞭なポケットとは異なるタンパク質構造に対して結合することを示したことは、タンパク質科学にも重要な知見を提供している。さらに、各PPIの性質に応じて、適切にライブラリーを選択することの重要性を示した点にも重要である。総じて、本論文はPPI阻害薬の探索手法の実現に向けた先駆的内容を含む内容であり、その科学的意義は高く評価できる。

平成31年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。