

( 続紙 1 )

|  |   |    |       |
|--|---|----|-------|
| 京都大学   | 博士 ( 薬 学 )  | 氏名 | 阿部 峰大 |
| 論文題目   | Development of peptide inhibitors of the receptor tyrosine kinase activity in a novel inhibitory mechanism (受容体型チロシンキナーゼに対する新規メカニズムを有する活性阻害ペプチドの開発) |    |       |
| (論文内容の要旨)  |   |    |       |
| <p>受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は癌細胞に過剰発現していることから、抗癌剤開発の標的分子として注目されている。多くのRTK阻害剤が開発されてきたが、その選択性の低さから生じる重篤な副作用が問題となっており、選択性の高いRTK阻害剤の開発が急務とされている。</p> <p>ペプチドKIFMKは、Na<sup>+</sup>チャンネルのIII-IVリンカー上のIFMモチーフに結合してNa<sup>+</sup>チャンネルをブロックすることで、Na<sup>+</sup>イオンの細胞外から細胞内への流入を阻止することが知られている。一方、RTKの一種であるインスリン受容体 (IR) の自己リン酸化部位周辺の一次構造は、Na<sup>+</sup>チャンネルのIII-IVリンカーのIFMモチーフ周辺の一次構造と類似しており、KIFMKはナトリウムチャンネルと同様にIRの自己リン酸化を阻害する。IFMモチーフと相同性の高いIRの自己リン酸化部位の一次構造を鋳型としたペプチドも、KIFMKと同様にIRの自己リン酸化を阻害すると考えられる。自己リン酸化部位はIRの内在性基質としてはたらくため、その結合は選択性が非常に高いことが期待される。そこで、本研究においては、2種類の受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化部位周辺の一次構造を鋳型として小型 (5～7残基) でありながら選択性の高い新規阻害ペプチドの設計、阻害効果の評価を行い、その作用機序の解明を目指した。</p> |   |    |       |
| <p><u>第一章 小型ペプチドによる上皮成長因子受容体の自己リン酸化阻害</u></p> <p>RTKの一種である上皮成長因子受容体 (EGFR) の4箇所の自己リン酸化部位を鋳型として、5～7残基のペプチドを設計、合成し、ペプチドによる溶液中のEGFRの自己リン酸化阻害効果をイムノブロットによって評価した。その結果、3箇所の自己リン酸化部位 (Tyr1068、Tyr1148、Tyr1173) 由来のペプチド (DYQQD、VPEYINQ、ENAEYLR) が阻害効果を示すことがわかった。自己リン酸化阻害効果を示したペプチドについて、様々なアミノ酸置換を施し、同様の評価を行った結果、阻害効果には芳香族アミノ酸が必須であることがわかった。また、2種類のペプチドについて、Asp、GluをそれぞれAsn、Glnに置換することによって (NYQQN、QNAQYLR)、阻害効果が大きく増加した。以上より、これらのペプチドはEGFRの活性を阻害する抗癌剤のシード化合物としての可能性をもつことが示唆された。</p>   |   |    |       |
| <p><u>第二章 上皮成長因子受容体と新規活性阻害ペプチドの相互作用様式の検討</u></p> <p>第一章において見出された、より高い阻害効果を示す阻害ペプチドであるNYQQN、QNAQYLRの作用機序についての検討を行った。ATPの濃度を変化させることでQNAQYLRの阻害効果が大きく変動したことから、このペプチドはATP競合阻害剤であると考えられる。NYQQNにおいてはATP濃度の影響がみられなかったことから、異なる作用機序によって阻害効果を示すと考えられる。ドッキングシミュレーションによってこれを支持する結果が得られた。また、蛍光分光法、ELISAによって、NYQQNは基質としてEGFRによってリン酸化を</p>  |   |    |       |

受けることがわかった。一方、分子動力学計算と結合親和性の評価によって、NYQQNはEGFRの基質結合部位に結合した状態で安定であるという、実験結果を支持する計算結果が得られた。以上より、NYQQNはEGFRの基質結合領域に作用する、新規の作用機序によってEGFRの活性を阻害すると考えられる。

### 第三章 阻害ペプチドによる脂質ナノディスクに再構成した上皮成長因子受容体の活性の阻害

脂質ナノディスクは膜蛋白質の再構成系として注目されている。EGFRをナノディスクに再構成した粒子を調製し、この粒子を用いたNYQQN、QNAQYLRの阻害効果の評価系の確立を行った。蛍光分光法によって、EGFRによる基質ペプチドのリン酸化を測定し、Michaelis-Mentenモデルに従って、EGFRの酵素活性を算出した。その結果、フリーのEGFRに比べナノディスク中のEGFRの活性は約3倍高いことがわかった。また、阻害ペプチドが存在する系においても同様の評価を行った結果、NYQQNはモデル基質ペプチドと競合することがわかった。

### 第四章 小型ペプチドによるインスリン受容体の自己リン酸化阻害

インスリン受容体 (IR) の自己リン酸化部位由来の5残基のペプチドを2種類設計し、それらによるIRの自己リン酸化阻害効果をイムノブロットによって評価した。また、ペプチドのアミノ酸に置換を施すことによる阻害効果の変化も合わせて評価した。これらの検討の結果、酸性アミノ酸を中性アミノ酸の置換することによって、阻害効果が大きく増強されることを見出した。ATPとの競合実験やドッキングシミュレーション、質量分析によって、中性アミノ酸に置換したペプチドはATP競合阻害剤であり、非置換体のペプチドはリン酸化反応を触媒する触媒ループに作用することで阻害効果を示すことがわかった。

(論文審査の結果の要旨)

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は癌細胞に過剰発現していることから、抗癌剤開発の標的分子として注目されている。多くのRTK阻害剤が開発されてきたが、その選択性の低さから生じる重篤な副作用が問題となっており、選択性の高いRTK阻害剤の開発が急務とされている。ペプチドKIFMKは、Na<sup>+</sup>チャンネルのIII-IVリンカー上のIFMモチーフに結合してNa<sup>+</sup>チャンネルをブロックすることで、Na<sup>+</sup>イオンの細胞外から細胞内への流入を阻止することが知られている。一方、RTKの一種であるインスリン受容体 (IR) の自己リン酸化部位周辺の一次構造は、Na<sup>+</sup>チャンネルのIII-IVリンカーのIFMモチーフ周辺の一次構造と類似しており、KIFMKはナトリウムチャンネルと同様にIRの自己リン酸化を阻害する。IFMモチーフと相同性の高いIRの自己リン酸化部位の一次構造を鋳型としたペプチドも、KIFMKと同様にIRの自己リン酸化を阻害すると考えられる。自己リン酸化部位はIRの内在性基質としてはたらくため、その結合は選択性が非常に高いことが期待される。そこで、本研究においては、2種類の受容体型チロシンキナーゼの自己リン酸化部位周辺の一次構造を鋳型として小型 (5～7残基) でありながら選択性の高い新規阻害ペプチドの設計、阻害効果の評価を行い、その作用機序の解明を目指した。

### 第一章 小型ペプチドによる上皮成長因子受容体の自己リン酸化阻害

RTKの一種である上皮成長因子受容体 (EGFR) の4箇所自己リン酸化部位を鋳型として、5～7残基のペプチドを設計、合成し、ペプチドによる溶液中のEGFRの自己リン酸化阻害効果をイムノブロットによって評価した。その結果、3箇所の自己リン酸化部位 (Tyr1068、Tyr1148、Tyr1173) 由来のペプチド (DYQQD、VPEYINQ、ENAEYLR) が阻害効果を示すことがわかった。自己リン酸化阻害効果を示したペプチドについて、様々なアミノ酸置換を施し、同様の評価を行った結果、阻害効果には芳香族アミノ酸が必須であることがわかった。また、2種類のペプチドについて、Asp、GluをそれぞれAsn、Glnに置換することによって (NYQQN、QNAQYLR)、阻害効果が大きく増加した。以上より、これらのペプチドはEGFRの活性を阻害する抗癌剤のリード化合物としての可能性をもつことが示唆された。

### 第二章 上皮成長因子受容体と新規活性阻害ペプチドの相互作用様式の検討

第一章において見出された、より高い阻害効果を示す阻害ペプチドであるNYQQN、QNAQYLRの作用機序についての検討を行った。ATPの濃度を変化させることでQNAQYLRの阻害効果が大きく変動したことから、このペプチドはATP競合阻害剤であると考えられる。NYQQNにおいてはATP濃度の影響がみられなかったことから、異なる作用機序によって阻害効果を示すと考えられる。ドッキングシミュレーションによってこれを支持する結果が得られた。また、蛍光分光法、ELISAによって、NYQQNは基質としてEGFRによってリン酸化を受けることがわかった。一方、分子動力学計算と結合親和性の評価によって、NYQQNはEGFRの基質結合部位に結合した状態で安定であるという、実験結果を支持する計算結果が得られた。以上より、NYQQNはEGFRの基質結合領域に作用する、新規の作用機序によってEGFR

の活性を阻害すると考えられる。

### 第三章 阻害ペプチドによる脂質ナノディスクに再構成した上皮成長因子受容体の活性の阻害

脂質ナノディスクは膜蛋白質の再構成系として注目されている。EGFRをナノディスクに再構成した粒子を調製し、この粒子を用いたNYQQN、QNAQYLRの阻害効果の評価系の確立を行った。蛍光分光法によって、EGFRによる基質ペプチドのリン酸化を測定し、Michaelis-Mentenモデルに従って、EGFRの酵素活性を算出した。その結果、フリーのEGFRに比べナノディスク中のEGFRの活性は約3倍高いことがわかった。また、阻害ペプチドが存在する系においても同様の評価を行った結果、NYQQNはモデル基質ペプチドと競合することがわかった。

### 第四章 小型ペプチドによるインスリン受容体の自己リン酸化阻害

インスリン受容体 (IR) の自己リン酸化部位由来の5残基のペプチドを2種類設計し、それらによるIRの自己リン酸化阻害効果をイムノブロットによって評価した。また、ペプチドのアミノ酸に置換を施すことによる阻害効果の変化も合わせて評価した。これらの検討の結果、酸性アミノ酸を中性アミノ酸の置換することによって、阻害効果が大きく増強されることを見出した。ATPとの競合実験やドッキングシミュレーション、質量分析によって、中性アミノ酸に置換したペプチドはATP競合阻害剤であり、非置換体のペプチドはリン酸化反応を触媒する触媒ループに作用することで阻害効果を示すことがわかった。

以上、上皮成長因子受容体自己リン酸化の阻害ペプチドの探索、相互作用様式の検討、上皮成長因子受容体の脂質ナノディスクへの再構成、およびインスリン受容体阻害への拡張の検討により、新規阻害ペプチドを設計しその有用性を明らかにした。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降