

## 【学位論文審査の要旨】

### 1 研究の目的

生体内の特定の分子を特異的かつ高感度に認識するプローブは、がんをはじめとする疾患バイオマーカーの検出ツールとして有用である。ペプチドアプタマーは、ランダム配列の分子ライブラリーの中から、任意のターゲット分子に対して特異的に相互作用する分子を進化分子工学的技法により探索するものである。本研究では、その原理を利用して、体内を循環している転移性癌細胞の診断マーカーとして有用な細胞膜タンパク質EpCAM、およびインフルエンザ・ウイルスをターゲットするペプチドアプタマーを探索した。さらにアプタマー内に非天然アミノ酸として蛍光基や電気重合性基を導入することにより有用性の高いセンシングプローブを開発することを目的とした。

### 2 研究の方法と結果

ペプチドアプタマーは、動物が免疫反応で生み出す抗体のように任意のターゲットに結合できる分子として、試験管の中だけでランダム配列ライブラリーから選別される。これまでに、血中循環腫瘍細胞で高発現するタンパク質である上皮系細胞接着分子 (EpCAM) に結合するペプチド配列がファージディスプレイを用いて探索され、報告されている。論文著者は、この12個のアミノ酸から構成されるペプチド配列の一つのアミノ酸を、親水・疎水環境に依存して蛍光強度が変化する環境依存性蛍光基 (7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール) を結合したアミノフェニルアラニンで置換し、6種類合成した。そして、EpCAMを高発現する細胞に添加して蛍光観察を行い、その中の2種類のペプチドは、洗浄操作をすることなく、EpCAMが存在する細胞膜表面にだけ蛍光シグナルを生じることがわかった。これは、アプタマーがEpCAMに結合することにより、蛍光基の環境が疎水性になったためと考えられる。

次に電気重合性のチオフェン基を導入したインフルエンザに対するペプチドアプタマーの選別を行った。まず、3,4-エチレンジオキシチオフェンを結合したアミノフェニルアラニンを担持したtRNAの調製を行った。そして、このミスアシル化tRNAの存在下、ランダム配列DNAライブラリーから転写・翻訳を行い、チオフェンを含むランダム配列ペプチドライブラリーをリボソームディスプレイとして作製した。このライブラリーの中からインフルエンザの不活化ウイルス粒子に結合するペプチドをアフィニティ選別し、mRNAの回収、cDNAへの逆転写、PCR増幅、そして再度ライブラリー選別を繰り返す進化分子工学のラウンドを6回行った。次世代シーケンサーを用いて、DNA配列を決定し、結合活性が高いペプチド配列を決定した。そのペプチド配列に従い、チオフェン含有ペプチドを有機合成し、インフルエンザ・ウイルスとの結合性を調べた。最も高いアフィニティを持つペプチドは、半数効果濃度 (EC<sub>50</sub>) が  $9.6 \pm 2.3 \mu\text{M}$  であった。

インフルエンザ・ウイルスを電気化学的に検出するには、ウイルス濃度に依存してペプチドアプタマーの重合性が変化する性質をもつ必要がある。結合性をもつペプチドの中で、

そのような性質をもつものを見出した。これは、ウイルスとペプチドアダプターが相互作用する際に、チオフェン基がインフルエンザ側と接触して重合が阻害されるためと考えられた。その結果、インフルエンザが存在すると重合が阻害され、生じる重合物が少なくなることによって電極の被覆が抑制され、インフルエンザの濃度に応じた電流が流れるようになった。検出限界は、 $12.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) で免疫クロマトグラフィのものに匹敵するものであった。

### 3 審査の結果

学位論文は四章から構成されている。

第一章では、進化分子工学に関する一般的背景が記載されている。核酸とペプチドをベースとする進化分子工学についてその概要が述べられ、続いてペプチドを基にした進化分子工学の手法の歴史的な展開が紹介されている。そして、非天然アミノ酸を含んだペプチドライブラリーからの様々な機能性ペプチドの選別に関する研究背景が記載されている。

第二章では、細胞に結合するだけで蛍光を発するペプチドアダプターに関する研究が記載されており、この原理を用いれば、これまで通常の抗体染色で行われてきた洗浄を行わないイメージングが可能となる。すなわちリアルタイムで分子の挙動を観察できることになるため、今後の発展が期待できる。

第三章では、電気化学センサーによるインフルエンザ検出の研究が記載されている。現在、一般的に行われている免疫クロマトグラフィを用いた方法に匹敵する感度であった。電気化学測定は、簡便に定量的な測定ができるため、様々な応用が期待されるものの、現在のところ血糖値測定に利用されているだけである。それは、これまでは主に酸化還元酵素を用いる方法に限られていたためと考えられる。本研究では、このような酵素を用いず、任意の分子を検出できる新しい方法を提案しており、より一般的なセンサーへの応用が期待される。

第四章では、研究のまとめが述べられており、これからの機能性ペプチドの展望が記載されており、これから期待される分野であることがわかる。今後、生物科学の一般的な分析、イメージングのためのツールとして期待できるとともに、医学診断分野でのバイオマーカー検出に大きな可能性を提供するものと考えられる。よって、本論文は博士（理学）の学位に十分値すると判定した。

### 4 試験及び試問の結果

本学の学位規則に従って最終試験を行った。公開の席上で論文内容を発表し、生命科学専攻教員による質疑応答をもって論文および関連分野についての最終試験とし、合格と判定した。