

令和元年6月2日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04653

研究課題名(和文)鏡像体タンパク質を用いた医薬品探索技術の開発と実証

研究課題名(英文)Development of a screening platform using mirror-image proteins and their application to drug discovery

研究代表者

大石 真也 (Shinya, Oishi)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：80381739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：天然物の鏡像体化合物群を仮想的にスクリーニングするための生物活性評価系を構築した。細胞増殖のシグナル伝達に關与する複数のタンパク質の化学合成プロセスを確立し、これを利用して鏡像タンパク質や各種プローブを合成した。得られたプローブを利用して天然物のスクリーニングを行い、複数のヒット化合物を得た。また、ヒット化合物の誘導体を合成して構造活性相関情報を取得するとともに、標的タンパク質との相互作用様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然物は新薬のシーズを提供する魅力的な創薬リソースであるが、これまでの創薬研究では自然界に存在する化合物のみがスクリーニングの対象として利用されてきた。本研究で新たに開発したスクリーニング手法を利用することにより、鏡の中に存在する天然物の鏡像体化合物群の生物活性評価が可能になった。本手法は、天然物の鏡像体の創薬リソースとしての有用性を検証するための有力なアプローチであるとともに、抗がん剤をはじめとするさまざまな疾患に対する医薬シーズの探索に有用である。

研究成果の概要(英文)：A facile access to an unexplored mirror-image library of chiral natural products using D-protein technology was established. For this purpose, the synthetic processes of three proteins, which are involved in cell signaling, were established. The resulting synthetic protein-based probes were applied to screening of a library of natural products to identify a number of hit compounds. The structure-activity relationship study and binding mode analysis of some hit compounds were also conducted.

研究分野：医薬品化学

キーワード：天然物 ペプチド キラル化合物 スクリーニング 医薬品探索 SH2ドメイン カスパーゼ BIRドメイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然物は、古くから用いられてきた代表的な創薬研究のリソースである。天然物そのものが抗生物質や抗癌剤として利用され、化学修飾や構造変換を施された誘導体がさまざまな医薬品として利用されてきた。また、天然物のリソースは、簡便には化学合成できない複雑かつ多様な分子構造を提供し、生物が生産する合目的性の観点から魅力的な医薬品のリード化合物が得られる可能性が高いと考えられている。しかしながら、近年、天然物からの創薬研究において単離・構造決定される化合物の多くが既報の天然物と同一もしくは類似のものであり、新規の骨格からなる天然物の発見の割合が低くなっていることが課題となっている。

2. 研究の目的

鏡の中に投影される天然物の鏡像異性体の多くは通常自然界に存在せず、また、天然物の全ての鏡像異性体を化学合成により得ることは現実的には不可能である。本研究では、生体分子の精密有機合成技術により得られる化学合成タンパク質などを活用して新しい生物活性評価法を構築し、キラルな天然物もしくは天然資源の“鏡像体化合物群”からの医薬品シーズ探索を可能にする新しい医薬品候補化合物探索プロセスを開発する。

3. 研究の方法

(1) 標的分子の鏡像体タンパク質の化学合成とフォールディング：細胞増殖・腫瘍増殖に関わるタンパク質ドメイン (約 100 残基程度) を選定し、それぞれの化学合成法を確立した。また、各ドメインの鏡像タンパク質と生物活性評価に必要な標識基 (蛍光、ビオチン等) を付与したタンパク質を化学合成し、フォールディングを経て活性タンパク質を取得した。

(2) 化学合成タンパク質を用いた生物活性評価系の構築とスクリーニング：タンパク質ドメインに結合するプローブペプチドを合成し、これを用いた複数の生物活性評価系を構築した。天然物のスクリーニングは、蛍光標識タンパク質を利用した化合物アレイ解析により行った。得られたヒット化合物は、蛍光偏光法もしくは ELISA による二次評価を行った。

(3) ヒット化合物の鏡像体の化学合成と生物活性評価：鏡像タンパク質 (D-タンパク質) 用いた二次評価により阻害活性が認められた化合物について、その鏡像体を化学合成し、天然型タンパク質 (L-タンパク質) に対する生物活性を評価した。また、それ以外のヒット化合物についても詳細な構造解析を経て、標的分子との相互作用様式を解析した。

4. 研究成果

(1) MDM2-p53 相互作用阻害剤の同定：スクリーニングにおいて D-MDM2-D-p53 相互作用に対する阻害活性を示したヒット化合物の L-MDM2 への作用を解析した。

まず、D-MDM2 に選択的に作用するピタミン E 誘導体 NP843 の鏡像体 (*ent*-NP843) をキラルプール法により合成した。*ent*-NP843 は L-MDM2 に対して選択的に阻害活性を示し、その活性値は NP843 の D-MDM2 に対する活性値と同等であった (図 1)。また、*ent*-NP843 の生物活性に必要な構造要素を明らかにする目的で、

クロマン骨格上の不斉中心とアルキル鎖の鎖長やメチル基の立体配置が異なる誘導体を合成し、構造活性相関情報を取得した。その結果、クロマン骨格上の不斉中心が S 配置であることが L-MDM2 との結合に必要であり、アルキル鎖上のメチル基の立体配置は活性の有無には関与しないことが示唆された。

Apomorphine は、キラル化合物であるにも関わらず L-MDM2 と D-MDM2 の両方に対して強力な MDM2-p53 阻害活性を示した。スクリーニングに用いた試料を詳細に分析するとともに、試料中に含まれる酸化体 (oxoapomorphine) の作用を解析したところ、MDM2-p53 阻害活性は apomorphine によるものではなく、oxoapomorphine が活性本体であることが判明した。また、MALDI-TOFMS 解析や Cys77 を Ser や Cys (Me) に変換した MDM2 変異体を用いた解析により、MDM2 中に存在する Cys77 のチオール基が oxoapomorphine に付加して共有結合を形成することで強力な生物活性を示すことを確認した。

(2) Grb2 SH2 ドメインの化学合成と生物活性評価系の構築：細胞内のシグナル伝達においてリン酸化チロシン (pTyr) を含むペプチド配列を認識して結合する SH2 ドメインのうち、Grb2 タンパク質に含まれる SH2 ドメイン [Grb2 (53-154)] の化学合成法を確立した (図 2)。102 残基

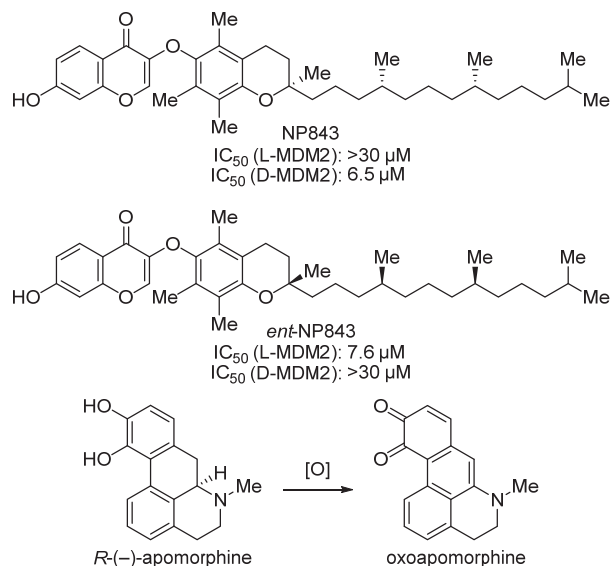


図 1 MDM2 阻害活性を示すヒット化合物の構造

からなる Grb2 SH2 ドメインを 3つのセグメントに分割し、N 末端側セグメント 1 と中間セグメント 2 をそれぞれペプチドヒドラジドとして調製した。続いて、ヒドラジド部分の酸アジドへの活性化とチオエステルへの変換を経て、native chemical ligation (NCL) を行った。この NCL を 2 回繰り返してペプチド鎖全長を構築後、NCL による連結の足がかりとして用いた Cys を Ala に変換することで、目的の Grb2 SH2 を取得した。Grb2 SH2 の鏡像タンパク質 (D-Grb2 SH2) は、D-アミノ酸を用いた同様のプロセスにより合成した。また、生物活性評価に利用する修飾基 (蛍光基、ビオチン) を有する Grb2 SH2 の修飾体は、あらかじめペプチド N 末端に修飾基を導入した N 末端側セグメントを用いて、同様の経路により合成した。

得られた化学合成タンパク質についてさまざまなフォールディング条件の検討を行い、適切な緩衝液中で透析を行うことで活性型タンパク質を取得した。タンパク質の構造及び活性は、CD スペクトル解析と表面プラズモン共鳴解析による pTyr 含有ペプチド [EGFR(1060-1076)] との結合親和性評価により確認した。また、L-Grb2 SH2 と D-Grb2 SH2 は EGFR(1060-1076) の L 体と D 体にそれぞれ選択的に結合し、化学合成により得られた Grb2 SH2 の十分なキラル認識能を確認した。

Grb2 SH2 ドメイン阻害剤の探索を目指して、2つの生物活性評価系を構築し、スクリーニングを行った。まず、アレイ表面上に天然物等を固定した化合物アレイを用いて、Grb2 SH2 に結合する化合物を検出する評価系を確立した。蛍光標識 L-Grb2 SH2 及び D-Grb2 SH2 は、アレイ上に固定した EGFR(1060-1076) (L 体、D 体) にそれぞれ立体選択的に結合し、優れた特異性で Grb2 SH2 の結合を検出できることを確認した。この化合物アレイ解析を用いて 29,707 化合物のスクリーニングを行い、L-Grb2 SH2 と D-Grb2 SH2 のいずれかに結合する 1,335 化合物を同定した。引き続き、これらのヒット化合物の Grb2 SH2 阻害活性を評価するために、ELISA による評価系を構築した。ビオチン標識 Grb2 SH2 をストレプトアビジンコートプレート上に固定した後、これに FLAG タグを有する EGFR(1060-1076)、抗 FLAG 抗体等を順次添加することで、Grb2 SH2 と pTyr 含有ペプチドの相互作用を検出する系を確立した。本法を用いて上述のヒット化合物の二次評価を行ったところ、D-Grb2 SH2 の pTyr 結合部位に作用する化合物は見出されなかった。一次スクリーニングにおけるヒット化合物の多くは Grb2 SH2 ドメインの pTyr 結合部位とは異なるタンパク質表面上等に作用するものであったと想定される。本研究での鏡像スクリーニングでは期待された阻害剤候補化合物は得られなかったものの、先例がない SH2 ドメインの化学合成プロセスを確立するとともに、化学合成により得られる SH2 ドメインタンパク質から生物活性評価系の構築が可能であることを明らかにした。

(3) Src SH2 ドメインの化学合成と生物活性評価系の構築 : Grb2 SH2 と同様にチロシンキナーゼ受容体上の pTyr を含むペプチド配列に結合する Src SH2 ドメイン [Src(145-251)] の化学合成プロセスを確立した (図 3)。Cys188 を介して Src SH2 ドメインを 2つのセグメントに分割し、N 末端側セグメント 6 と C 末端側セグメント 9 をそれぞれ Fmoc 固相合成法により合成した。続いて、N 末端側セグメント 6 について Dbz の活性化とチオエステルへの変換反応に付した後、C 末端側セグメント 9 との NCL により、L-Src SH2 を得た。化合物アレイ解析に用いる蛍光標識基を導入した Src SH2 ドメインは、N 末端にあらかじめ蛍光基を導入した N 末端側セグメントを用いることにより、同様のプロセスで合成した。また、鏡像タンパク質 D-Src SH2 も同様に合成した。得られた化学合成タンパク質は、それぞれ文献既知のフォールディング条件に付すことで、活性タンパク質を取得した。

得られた Src SH2 の構造と生物活性を解析した。L-Src SH2 と D-Src SH2 は対称形の CD スペクトルを示し、それぞれが鏡像の構造であることを確認した。また、表面プラズモン共鳴解析により、L 体および D 体の Src SH2 がそれぞれ L 体と D 体の pTyr 含有ペプチド (hmT pY324) に選択的に結合することを明らかにした。さらに、Src SH2 の N 末端に付した蛍光基は、hmT pY324 への結合に影響を与えないことを確認した。

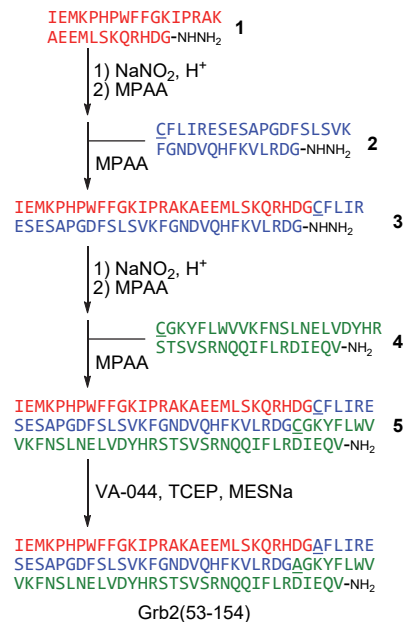


図 2 3つのペプチドセグメントを用いた Grb2 SH2 ドメインの化学合成

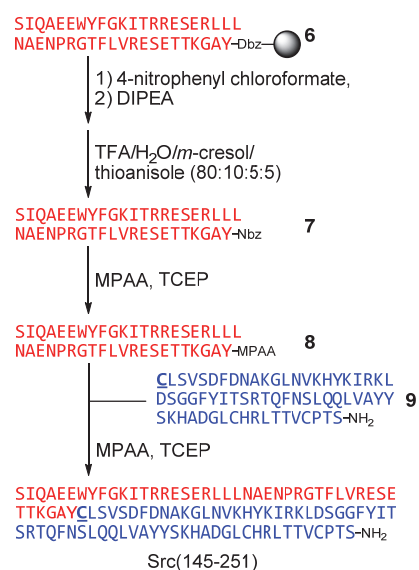


図 3 2つのペプチドセグメントを用いた Src SH2 ドメインの化学合成

これらの活性型 L-Src SH2 及び D-Src SH2 を利用して、複数の生物活性評価系を構築した。まず、Src SH2 に結合する天然物を探索するための化合物アレイ解析を用いた評価系を確立した。蛍光標識 Src SH2 は、アレイ上に固定した hmT pY324 を立体選択的に認識した。この系を用いて 22,097 検体の解析を行い、1,269 のヒット化合物を同定した。このうち 108 種類が D-Src SH2 選択的に結合活性を示すものであった。また、Src SH2 と pTyr 含有ペプチドとの結合に対する阻害活性を評価するために、ELISA、蛍光偏光法及び表面プラズモン共鳴による検出を利用した 3 種類の結合阻害活性評価系を確立した。このうち、ELISA による阻害活性評価系を用いて上述のヒット化合物の二次評価を行い、Src SH2 と pTyr 含有ペプチドの結合を阻害する 2 化合物を同定した。

(4) XIAP BIR3 ドメインタンパク質の化学合成と生物活性評価系の構築：カスパーゼの機能を調節する inhibitor of apoptosis proteins (IAP) タンパク質の baculovirus IAP repeat (BIR) ドメイン構造の化学合成プロセスを確立した (図 4)。X-linked IAP (XIAP) タンパク質の BIR3 ドメイン [XIAP (241-356)] を Ala263、Cys300、Cys327 部位における 3 回の NCL により合成することとし、4 つのセグメントを固相合成により取得した。続いて、Dbz 基の活性化とチオエステルの調製を経て、N 末端側セグメント 14 と C 末端側セグメント 20 をそれぞれ合成した。ペプチド 14 の Cys263 を脱硫反応により Ala に変換した後、酸アジドへの活性化とチオエステル形成を経て C 末端側セグメントとの NCL を行い、目的の XIAP BIR3 を合成した。鏡像タンパク質 D-XIAP BIR3 は同様の経路で、また、蛍光標識体とビオチン標識体はペプチド N 末端にリンカーを介して標識基を導入したセグメントを利用することにより合成した。

得られた各タンパク質は、文献既知の方法によりフォールディング処理を行った後、表面プラズモン共鳴解析により second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC) の N 末端ペプチドとの結合親和性を評価した。各タンパク質は、SMAC ペプチドの L 体及び D 体と立体選択的に相互作用し、蛍光基やビオチンは相互作用に影響を与えないことを確認した。

続いて、蛍光標識 XIAP BIR3 を用いた化合物アレイ解析により、天然物からの XIAP BIR3 ドメイン阻害剤の探索を行った。まず、蛍光標識 XIAP BIR3 が、アレイ上に固定した SMAC ペプチドをそれぞれ立体選択的に認識することを確認した。この系を用いて 22,097 検体のスクリーニングを行ったところ、L-XIAP BIR3 に結合する 451 化合物と、D-XIAP BIR3 に結合する 281 化合物を同定した。

XIAP BIR 上の SMAC 結合部位に作用する化合物の同定を目的として、SMAC ペプチドの結合阻害活性を定量するための ELISA と蛍光偏光法による生物活性評価系を構築した。上述のスクリーニングにより得られたヒット化合物について ELISA による二次評価を行ったところ、SMAC 結合部位に作用する化合物は見出されなかった。このスクリーニングでは SMAC 結合部位に作用する阻害剤は同定できなかったものの、これまでに報告例がない BIR ドメインの化学合成法を確立し、鏡像スクリーニングのための複数の生物活性評価系を構築することができた。BIR ドメインはさまざまな IAP タンパク質に含まれるドメイン構造であることから、今後同様のアプローチによる鏡像スクリーニングにより新たな抗がん剤等の候補化合物の探索が可能である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① S. Tsuda, M. Mochizuki, H. Ishiba, K. Yoshizawa-Kumagaye, H. Nishio, S. Oishi, T. Yoshiya, Easy-to-attach/detach solubilizing tag-aided chemical synthesis of an aggregative capsid protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* 査読有、57 巻、2018、2105-2109 DOI: 10.1002/anie.201711546
- ② K. Shu, T. Noguchi, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada, H. Ohno, N. Fujii, S. Oishi, Synthesis of the Src SH2 domain and its application in bioassays for mirror-image screening. *RSC Adv.* 査読有、7 巻、2017、38725-38732

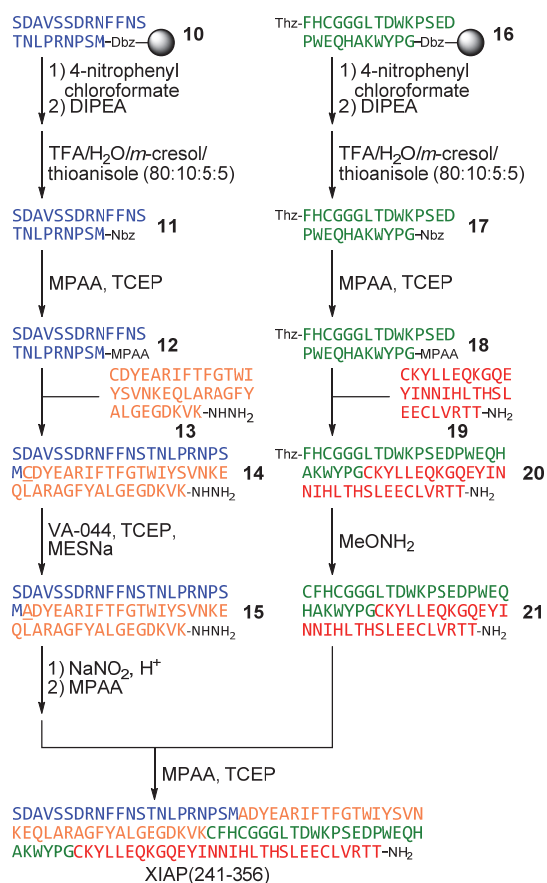


図 4 4 つのペプチドセグメントを用いた XIAP BIR3 ドメインの化学合成

DOI: 10.1039/C7RA07445J

- ③ H. Ishiba, T. Noguchi, K. Shu, H. Ohno, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada, N. Fujii, S. Oishi, Investigation of the inhibitory mechanism of apomorphine against MDM2-p53 interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有、27 巻、2017、2571–2574
DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.03.082
- ④ T. Noguchi, H. Ishiba, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada, H. Ohno, N. Fujii, S. Oishi, Synthesis of Grb2 SH2 domain proteins for mirror-image screening systems. *Bioconjug. Chem.* 査読有、28 巻、2017、609–619
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00692
- ⑤ T. Noguchi, S. Oishi, K. Honda, Y. Kondoh, T. Saito, H. Ohno, H. Osada, N. Fujii, Screening of a virtual mirror-image library of natural products. *Chem. Comm.* 査読有、52 巻、2016、7653–7656
DOI: 10.1039/c6cc03114e

[学会発表] (計 24 件)

- ① 野口太朗 他、天然物とその誘導体の鏡像体化合物群の活用を目指した新規スクリーニング法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会、2015 年
- ② H. Ishiba 他、Investigation of inhibitory mechanism of apomorphine against MDM2-p53 interaction、第 52 回ペプチド討論会、2015 年
- ③ 野口太朗 他、キラルな天然有機化合物の鏡像体群をリソースとした MDM2-p53 間相互作用阻害剤の探索、第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2015 年
- ④ T. Noguchi 他、Novel screening approach for drug discovery from virtual mirror-image library of natural products、*Pacificchem* 2015、2015 年
- ⑤ 大石真也、創薬シーズ探索のためのものづくり：鏡の中の化合物へのアプローチ、日本化学会第 96 春季年会、2016 年
- ⑥ 周敬棠 他、化学合成タンパク質を利用した c-Src SH2 ドメイン阻害剤の探索法の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、2016 年
- ⑦ K. Shu 他、Development of screening systems for c-Src SH2 domain inhibitors using synthetic proteins、第 53 回ペプチド討論会、2016 年
- ⑧ T. Noguchi 他、Development of a screening system for Grb2 SH2 domain inhibitors using synthetic proteins、第 53 回ペプチド討論会、2016 年
- ⑨ 周敬棠 他、鏡像体タンパク質を利用した c-Src SH2 ドメイン阻害剤の探索法の開発、日本薬学会第 137 回年会、2017 年
- ⑩ 大石真也、鏡像レジデンスを活用した医薬品探索、日本化学会第 98 春季年会、2018 年
他 14 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizo/index.html>

6. 研究組織

(1) 連携研究者

連携研究者氏名：斎藤臣雄

ローマ字氏名：Tamio Saito

所属研究機関名：独立行政法人理化学研究所

部局名：環境資源科学研究センター

職名：ユニットリーダー

研究者番号 (8 桁)：40260228

連携研究者氏名：近藤恭光

ローマ字氏名：Yasumitsu Kondo

所属研究機関名：独立行政法人理化学研究所

部局名：環境資源科学研究センター

職名：専任研究員

研究者番号 (8 桁)：80333342

連携研究者氏名：柏田良樹

ローマ字氏名：Yoshiki Kashiwada
所属研究機関名：徳島大学
部局名：ヘルスバイオサイエンス研究部
職名：教授
研究者番号（8桁）：30169429

連携研究者氏名：藤井信孝
ローマ字氏名：Nobutaka Fujii
所属研究機関名：京都大学
部局名：薬学研究科
職名：名誉教授
研究者番号（8桁）：60109014

連携研究者氏名：大野浩章
ローマ字氏名：Hiroaki Ohno
所属研究機関名：京都大学
部局名：薬学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：30322192

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。