

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18897

研究課題名(和文)環状ペプチドの低分子リード化

研究課題名(英文)The efficient transformation from cyclic peptide to lead ligand

研究代表者

一ノ瀬 亘 (ICHINOSE, Wataru)

北海道大学・薬学研究院・特別研究員(PD)

研究者番号：00636409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では環状ペプチドを基にしてペプチドミメティックとしての低分子リード化合物を効率的に開発する方法の確立を目指した。環状ペプチドとその標的タンパク質の結晶構造情報から、リガンド結合に必要となるアミノ酸残基、およびその空間配置を解析した。配座制限に有効なシクロプロパン骨格を用いて設計したバーチャルライブラリーを用意してスクリーニングを行い、特定の骨格によって環状ペプチドの活性配座を模倣できることが分かった。選定したフォーカスライブラリーの合成を行い、特に非対称アルキルエーテルの合成の検討を経て、共通中間体の合成まで達成した。

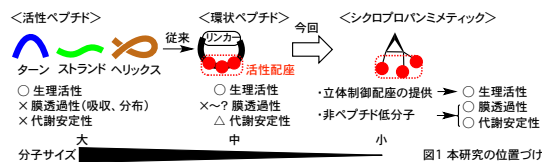
研究成果の概要(英文)：The research purpose is to develop the efficient transformation from cyclic peptide to lead ligand in low molecular size. By the crystal structure of a cyclic peptide and target protein and the analysis based on Molecular Dynamics, the critical parts of amino acid residue and spacial arrangement were determined. The library of virtual compounds was designed with the cyclopropane frames that effectively restricted the molecular conformation, and screened by the model prepared as the above mentioned. A specific frame showed better agreement than the others. The synthesis of the focused library compounds was conducted. After many consideration, the preparation of common intermediate was accomplished.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチドミメティック 計算化学 ライブラリー合成

1. 研究開始当初の背景

鎖状生理活性ペプチドは、通常、高極性官能基を有し、代謝分解される、細胞膜透過性が低いなどの欠点を持つ。そのため、主鎖窒素のメチル化、非天然アミノ酸による置換、環状化などの構造改変による欠点の克服が試みられる。特に環状ペプチドは天然に見られ、活性、代謝安定性の向上、構造変化を制御して細胞膜透過性が改善された例も知られる。しかし、環状ペプチドの多くは6~15個程度のアミノ酸配列からなる分子量1000程度の大分子であり、実際に上述の問題点を解決して上市されたものは極めて少なく、膜透過性改善のメカニズムも確立されていない。即ち、“創薬原石”と言える高価値な環状ペプチドが十分に活用されていないのが現状である。申請者は、ペプチドの活性配座を非ペプチド性有機低分子で模倣するペプチドミメティックに注目した。環状ペプチドにおいて、標的タンパク質との相互作用を担う官能基・立体配座情報を抽出し、その情報を構造制御した有機低分子へ集約することができれば、高活性な官能基とその配座を保持し、かつ代謝や吸収の問題解決のための多様なチューニングが可能となる。所属研究室では、シクロプロパン骨格を有するペプチドミメティックの立体異性体が、βターンやβストランド等のペプチド二次構造を模倣することを示した (A. Mizuno, *Dr. Thesis 2013*, and *Org. Lett. 2013*, 15, 1686)。即ち本骨格は、多様な環状ペプチド-タンパク質相互作用に対応した立体配座を提供できる。この点に着目し、環状ペプチドヒット化合物の構造情報を、シクロプロパンペプチドミメティックへ集約することで先の問題を一挙に解決する方法論になると考えた (図1)。Structure-Based Drug Design (SBDD) または Ligand-Based Drug Design (LBDD) の手法を用いて環状ペプチド活性配座のアミノ酸残基を同定し、バーチャルスクリーニングによって、活性配座を模倣するシクロプロパン立体異性体を選別し、更にその最適化により効率的に活性リガンド開発が可能となる。

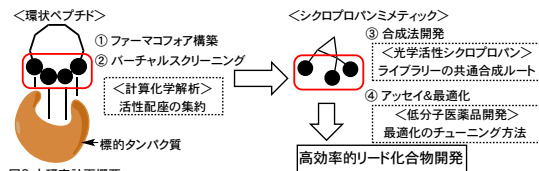


2. 研究の目的

本研究では環状ペプチドの活性配座、またはタンパク質との相互作用における三次元情報を元に、シクロプロパン骨格のミメティックのリード化合物を開発する (図2)。

本方法論を確立するための課題として、RAPID (rapid peptide integrated discovery) を開発した東京大学薬学研究科の菅教授の研究で発見された JMJD2a タンパク質-環状ペプチドを設定した。RAPID 法

で発見したリガンドは、非天然アミノ酸1個を含む14残基からなる環状ペプチドであり、そのままでは適切なリード化合物ではない。従って、タンパク質との相互作用部位を特定し、その立体配座を低分子リガンドで模倣することによって、リード化合物創出を容易なものにする。



3. 研究の方法

本研究では計算化学手法と有機合成化学の組み合わせによる非ペプチド低分子リガンド開発の方法論を確立する。

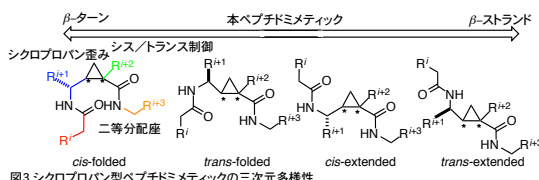
本方法論は以下の4工程から成る。即ち、(1)環状ペプチド-標的タンパク質スクリーニングで得られた三次元的構造情報を元に、計算化学解析を用いてファーマコフォアを構築する。(2)バーチャルスクリーニングからシクロプロパンミメティックの最適ライブラリー構造を選定する。(3)ミメティック合成法を開発し、共通中間体からの迅速合成によってライブラリーを用意する。(4) in vitro アッセイと構造最適化を行い、非ペプチドリード化合物を創出する。

(1) ファーマコフォア構築

SBDDに基づき、標的タンパク質と強く相互作用するペプチドの活性配座の情報を抽出する。即ち、環状ペプチド-タンパク質の三次元構造データを用いて分子動力学計算 (Molecular Dynamics: MD) を実施し、摂動を与えても相互作用が維持されるアミノ酸残基3~4個を鍵残基として特定する。

(2) バーチャルスクリーニング

シクロプロパンミメティックに活性部位の残基・配座情報を集約し、実際に合成するライブラリーを選定する。シクロプロパンミメティックは、シクロプロパンの特徴であるシス/トランス固定、シクロプロパン歪み (立体的自由度のないシクロプロパン環上の置換基間に働く強力な立体反発)、二等分配座 (シクロプロパン環と不飽和結合の共役による立体電子効果) に基づき、様々な三次元構造制御を実現できる。先行研究において、本シクロプロパンミメティックは、活性テトラペプチドに多く見られるβターンからβストランドまでの広範な三次元構造を効果的に模倣できることが示されている (図3)。



(3) 合成法開発

1つの基本構造 (trans-folded) を例として以下に合成戦略を概説する (図4)。光学活性エピクロロヒドリン **1** から Ellman イミン **2** に導き、不斉炭素骨格 (R1) を構築する。**3** から水酸基部の脱保護とエーテル結合構築 (R3) を行う。**4** を共通中間体とし、アミノ基、カルボキシル基の脱保護と対応する残基部 (R2, R4) の縮合を行い、目的物を合成する。両端残基の構造改変が容易であり、さらに異なる骨格で置換基の配列が変更しても対応可能な合成設計である。実際には (2) で選定したライブラリーを合成する。単結晶作製も行い、実際のリガンド立体構造と計算での活性配座を比較する。

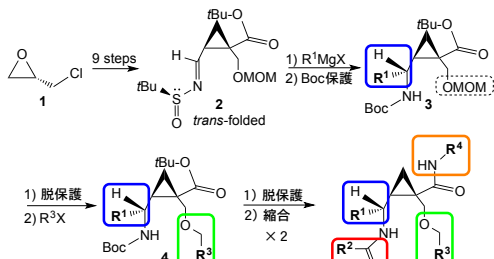


図4 合成ルート

(4) アッセイと構造最適化

JMJD2a は、ヒストンの部位選択的脱メチル化能を持ち、遺伝子転写の調節因子である。(R. Janknecht, *et al. Cancer Res.* **2013**, *73*, 2936.) 従って、このリガンド開発によって新規抗がん剤開発につながる。

(3) で得たライブラリーを用いて *in vitro* アッセイ①を行う (図5)。会合定数 (Kd) と翻訳合成タンパク質の産生量で薬理評価を行う。ライブラリーのアッセイ結果を解析し、バーチャルスクリーニング評価との相関精度を調べる。またライブラリーの構造活性相関に応じて、(2) の計算構造を実際の活性配座構造に近づくよう修正する。低分子医薬品開発の構造修飾方法に従い、最適化を行う。側鎖長やアミノ酸残基の種類または活性等価体となる置換基を用いてバーチャルスクリーニング②を行う。選別したライブラリーを合成③し、再アッセイ評価、さらに精密な改良を行う。①~③を繰り返して nM オーダーのリガンドを開発する。また有機低分子化による代謝安定性、経口吸収性、組織移行性の向上についてもアッセイ評価を行う。

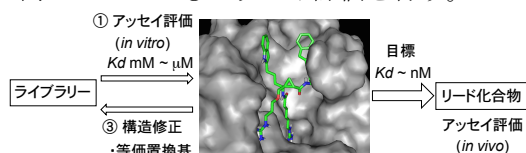


図5 構造最適化・鎖長調整 ② 立体配座修正&再計算

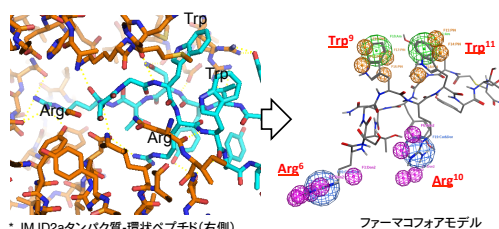
本研究は共同研究であり、前述の通り研究対象となる環状ペプチド-JMJD2a タンパク質複合体の結晶解析データは東京大学、菅教授に御提供頂いた。(4) のアッセイを同じく菅教授に御依頼する予定である。(1)、(2) について SBDD のリード研究者である産業技術総合研究所の広川貴次博士に御指導、御協

力いただく。すべての化合物の合成と計算解析は申請者が行う。

4. 研究成果

(1) 計算化学解析とバーチャルスクリーニング

研究課題として、共同研究者である東京大学・菅教授が解析したヒストン脱メチル化酵素 JMJD2a タンパク質-環状ペプチド (14 残基) の X 線結晶構造データを用いた (図6左)。MD 解析の結果、環状ペプチド中の主鎖および側鎖で JMJD2a タンパク質と最も強く水素結合を形成した残基は二つの Arg であり、疎水性相互作用では二つの Trp 残基であることが分かった。この4残基を鍵残基として抽出し、それぞれの残基で働く水素結合、 π - π 相互作用の空間配置を元にファーマコフォアモデルを構築した。



* JMJD2aタンパク質-環状ペプチド(右側)

図6 X線結晶構造解析

シクロプロパンの立体制御能を活用したテトラペプチドミメティックを基本構造として、次に述べるライブラリー化によって広範なケミカルスペースの探索が可能となる。

(図7) まず 1,1,2-三置換光学活性シクロプロパン骨格における置換基 ABC または ABD の組み合わせは 24 通りである。置換基について、A と C,D はアミド結合が元のペプチド主鎖に対応する。B のエーテル結合は合成の容易さ、立体的嵩の低減を狙った。C, D の不斉炭素部はシクロプロパン歪みによって配座制御される。側鎖として X には 1) で抽出した鍵残基の Trp および Arg に対応するインドール、グアニジン鎖長の異なるアルキル側鎖を導入した。各官能基を 2 個ずつ、側鎖長を 3 種用いる組み合わせで 486 通りとなった。従って、本ライブラリーは 11664 化合物で構成され、さらに各側鎖の結合角を回転して配座を発生させることで、2,870,815 個のライブラリーデータを構築した。

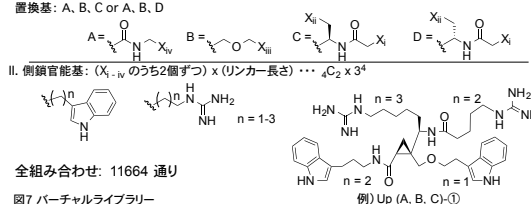
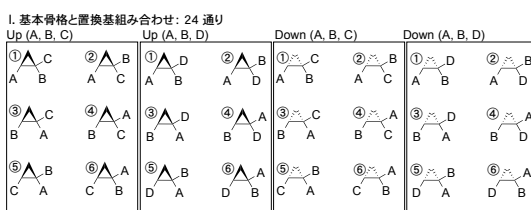


図7 バーチャルライブラリー

以上を(1)で構築したファーマコフォアモデルを対象にバーチャルスクリーニングを行った。実際に合成するフォーカスライブラリーを以下のように選定した(図8)。まずファーマコフォアにフィットする配座を選別し、さらに標的タンパク質とのドッキングシミュレーションを行った。この時、相互作用エネルギーをスコア化し、上位1%以内に含まれる配座を各骨格で整理すると、その分布に偏りが生じた。最も多くの配座が見られた **down_abc_1** において更に約半数の化合物が **B** および **D** 側鎖のリンカーが炭素数3となっていた。従って、残りの **A** および **C** 側鎖でリンカー長の異なる9つの化合物をフォーカスライブラリーに選定した。

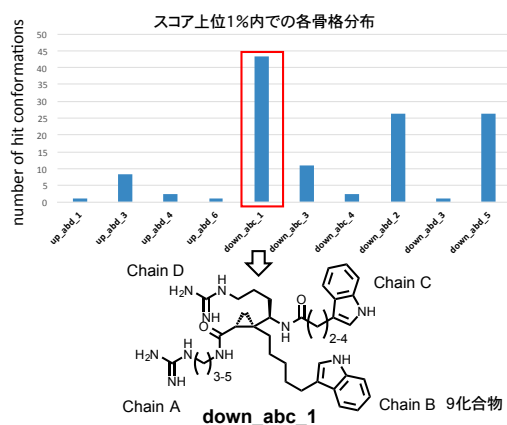


図8 フォーカスライブラリーの選定

(2) シクロプロパンライブラリーの合成 研究計画時に検討していた合成ルートとは異なるが、不斉炭素部位の構築などはそのまま適応できた(図9)。また、インドール環は合成過程における分解を抑えるため、活性等価体と言われるナフタレン環として合成を行った。

最初の側鎖部となる **A** の水酸基からのエーテル化に予想以上の検討が必要となってしまった。最終的に過剰の試薬を用いることで良好な収率でアリルエーテル化が進行し、続くオレフィンメタセシス反応でナフタレン環を連結した。

Ellman イミンから十分な選択性で目的のジアステレオマー **B** が得られた。付加したアリル基を足がかりに水酸基へ変換し、光延反応を用いて、二つ目の側鎖となるグアニジン部を構築した。その後、保護水酸基からカルボン酸へと導き、フォーカスライブラリーの共通中間体となる **C** の合成まで達成した。アルキル鎖長の異なる保護グアニジン有するアミン、およびナフタレン環有するカルボン酸と順次アミド結合で連結させることによって、一連の目的ライブラリー化合物を得る予定である。

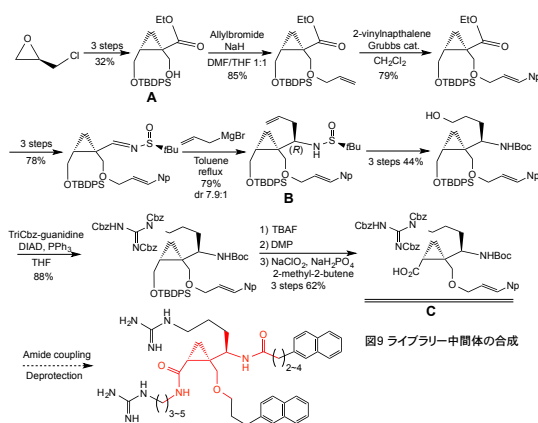


図9 ライブラリー中間体の合成

(3) らせんペプチドの合成と構造活性および物性との相関研究

本研究との比較として、よりペプチドの基本構造に類似したペプチドミメティック研究であるペプチドにも注目した。ペプチドにおける側鎖の配列や置換基の差異が、化合物の活性および溶解性などの分子全体の物性に与える影響を調べることによって、当該課題の有用性の検証ならびに対照となると考えた。

そこで天然の抗菌ペプチドを模倣するらせんペプチドを基に、アミノアルキル側鎖をカルボン酸、ピリジンにした新たなペプチドに加え、配列順のみを変えた系統的ライブラリーを合成した。ペプチドの簡易計算モデルである Heliquet を利用して、配列の異なるライブラリー化合物群の疎水性モーメントを算出した。実験的に得た各ペプチドの分配係数や逆走 HPLC 分析による溶出時間など、リード化合物に重要な物性面では計算との相関が明確には得られなかった。一方、抗微生物、抗菌活性を調べたところ、参照ペプチドの疎水性モーメントが大きなペプチドで活性が向上する相関が見られた。

(4) まとめ

以上、本研究では環状ペプチドを基にしてペプチドミメティックとしての低分子リード化合物を効率的に開発する方法の確立を目指した。まず、環状ペプチドとその標的タンパク質の結晶構造情報から、結合に必要なアミノ酸残基およびその空間配置を解析した。続いて、配座制限に有効なシクロプロパン骨格を用いて設計したバーチャルライブラリーの用意、ならびにスクリーニングを行い、特定の骨格によって環状ペプチドの配座を模倣できることが分かった。選定したフォーカスライブラリーの合成検討を行ったが、非対称アルキルエーテルの合成に予想以上の検討が必要となり、結果的に計画の進捗に影響してしまった。共通中間体の合成まで達成し、今後目的ライブラリーを用意し、実際のアッセイ評価を行う。またリード化合物としての物性評価も合わせて行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Wataru Ichinose, Harry R. King, Paul W. Denny,
Steven L. Cobb

“Synthesis and evaluation of novel ‘scrambled’
peptoids”

RSC Organic Division North East Regional
Meeting

2017年3月29日

Durham (United Kingdom)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

一ノ瀬 亘 (ICHINOSE, Wataru)

北海道大学・大学院薬学研究院・特別研究員

研究者番号 : 00636409