

令和 2 年 12 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2018

課題番号：18H05974

研究課題名(和文)多様性指向型蛍光ライブラリーを用いた新規タンパク質間相互作用阻害剤の創製研究

研究課題名(英文)Development study of protein-protein interaction inhibitors through a diversity oriented fluorescence library approach

研究代表者

山口 繭美(YAMAGUCHI, Mayumi)

名古屋大学・創薬科学研究科・特任助教

研究者番号：80822345

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、多様性指向型蛍光ライブラリーを用いて新規タンパク質間相互作用阻害剤創製方法確立すべく、Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)-NRF2 (NF-E2-related factor 2)タンパク質の間に存在する相互作用を最初の標的として研究に着手した。まず初めに、タンパク質間相互作用を阻害する化合物としてNRF2のC末端側の配列を模倣したペプチド誘導体を設計し、Fmoc固相合成法を用いて鎖状ペプチド誘導体を得た。また、蛍光ライブラリーに使用するためのキサントゲン骨格をもつ新規蛍光物質の設計と合成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はKEAP1/NRF2の新規タンパク質間相互作用阻害剤の開発を通して、あらゆるタンパク質間阻害剤開発におけるロールモデルの提案を行うものである。また、本研究によって得られる分子は、分子内の蛍光基の作用で、配列非改変型タンパク質を用いてin vitroの生物活性測定試験を行えるため、実際の生体内環境に近い形で構造活性相関研究ができる。この特性は、しばしば問題となるタンパク質レベルと細胞レベルでの生物活性測定試験の間に生じるギャップやin vitro/in vivo試験の間での生物活性測定試験のギャップを小さくし、効率的創薬リード創出ができる点で学術的意義及び社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文):In this study, we tried to develop new protein-protein interaction inhibitors using diversity-oriented fluorescent library approach. First of all, we decided to use Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) and NRF2 (NF-E2-related factor 2) as a model case, and designed and synthesized of analogs, which imitate C-terminus moiety of NRF2. These analogs were synthesized using solid phases peptide synthesis methods. Next, we designed and synthesized fluorescent substances, which have a xanthene structure.

研究分野：創薬科学

キーワード：タンパク質間相互作用 蛍光物質 ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新しい作用機序を持つ医薬品を開発する際、タンパク質-タンパク質相互作用 (PPIs) が近年、着目されている。しかし、タンパク質-小分子相互作用を標的とした従来の創薬研究とは異なり、薬がタンパク質と相互作用すべき面積が広範で、結合部位が浅いなどの理由から既存の方法論で PPI 阻害剤を開発することは難しい。そこで、本研究では PPIs を標的とした創薬研究方法論の構築を目指し、多様性指向型蛍光ライブラリーアプローチ (Diversity-Oriented Fluorescence Library Approach, DOFLA, Acc. Chem. Res. 2014, 47, 1277) を利用した化学センサー搭載型創薬リードの創出と、構造活性相関研究 (Structure-Activity Relationship study, SAR study) による分子構造最適化、およびファーマコフォア抽出によって、新規 PPI 阻害剤の開発を行う。

KEAP1/NRF2 システムは細胞の生命維持機構の一つである。過酸化物質などの酸化ストレス存在下、KEAP1 がプロテアソームにより分解され、KEAP1 と複合体を形成することによって細胞質に留められていた NRF2 が核内へと移行する。その後、NRF2 は核内で生体防御機構に関連する遺伝子発現を活性化し、抗酸化剤応答システムやアポトーシスに深く関与することが知られていることから、KEAP1/NRF2 は抗がん剤や認知症治療薬開発の標的タンパク質として着目されている。これらのことを踏まえ、本創薬研究ではこの KEAP1/NRF2 を用いて PPI 阻害剤開発のための創薬研究方法論の確立を試みる。

### 2. 研究の目的

タンパク質-タンパク質相互作用 (protein-protein interactions, PPIs) は生体の生命機能維持や病状の重篤化など生命と病態に密接に関連している。本研究では、PPIs を創薬の標的とし、環状ペプチド誘導体を用いた創薬リードの創出と構造活性相関研究による分子構造最適化を通して、PPI 阻害剤開発における創薬研究方法論の確立を試みる。また、蛍光官能基をはじめとする化学センサーと薬理作用を示す構造を同時に持つ分子は診断と治療を兼ねた使用が可能で、血中の腫瘍マーカーなどによる確定診断が難しい場合において用いられる治療薬となり臨床上極めて有用な薬となることから、本研究では化学センサー搭載型 PPI 阻害剤の開発に取り組むこととした。

### 3. 研究の方法

本研究では KEAP1/NRF2 の化学センサー搭載型 PPI 阻害剤創出を目指し、多様性指向型蛍光ライブラリー構築を通して新規 PPI 阻害剤を創出する。標的タンパク質とする KEAP1 は NRF2 の特定のドメイン内に含まれる 6-10mer のペプチドモチーフと相互作用することが知られており、まず始めに、この NRF2 のペプチドモチーフを模した環状ペプチド蛍光ライブラリーを構築する。ライブラリーを構築する分子の合成は、市販のペプチド固相合成用樹脂を適切に修飾したものに *m*-アミノフェノールを担持させ、樹脂上で化学センサー部の構築と合成するペプチド鎖の N 末側アミノ酸を導入する。続いて C 末端側アミノ酸を導入し、既存のペプチド固相合成法に倣ってペプチド鎖の伸長と、環化反応を行う。次に不活性型から活性型への変換法確立とその変換効率を化学センサーの蛍光強度などから解明し、確立した合成法で環状ペプチド蛍光ライブラリーを構築する。構築したライブラリーを用いて SAR 研究に着手する。まずライブラリーの化合物が担持された樹脂をそれぞれ 96 穴のプレートに入れ、標的タンパク質 (KEAP1) と強く結合する誘導体を除外し不活性環状ペプチドを抽出する。次に不活性分子を活性分子へ変換し、蛍光強度から各分子の変換効率を求める。また、液相成分に含まれる活性分子を用いた *in vitro* 生物活性測定試験を行い、高活性環状ペプチドを抽出する。その後、高効率で活性種へと変換され、高活性環状ペプチドを生成する不活性環状ペプチドを樹脂から切り出し、細胞系での生物活性測定試験を行う。そこで、がん細胞内特異的に化学センサーが機能し活性ペプチドを

放出する様子を蛍光分子の局在と強度から観察し、細胞増殖抑制活性も測定する。これらの結果をもとに生物活性や誘導体の細胞膜透過性を考慮し、最適なアミノ酸配列やファーマコフォアを同定する。また、環状ペプチドの溶液中における三次元構造と生物活性の相関を解明し、PPI 阻害剤の活性配座を同定した上で、新たな PPI 阻害剤分子の設計と合成を行う。これらの過程を繰り返し、より高活性な化学センサー搭載型 PPI 阻害剤の創製を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、多様性指向型蛍光ライブラリーを用いて新規タンパク質間相互作用阻害剤創製方法確立するべく、Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)-NRF2 (NFE2-related factor 2) タンパク質の間に存在する相互作用を最初の標的として研究に着手した。まず初めに、タンパク質間相互作用を阻害する化合物として NRF2 の C 末端側の配列を模倣したペプチド誘導体を設計し、Fmoc 固相合成法を用いて鎖状ペプチド誘導体の合成を行った。すなわち 2-クロロトリチル樹脂に Fmoc 保護されたアミノ酸を担持し、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン(DBU)を用いて Fmoc 基を除去した後、1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドヘキサフルオロホスファート (HBTU)を用いて、次の Fmoc 保護されたアミノ酸の縮合を行った。脱保護、縮合を繰り返し、トリフルオロ酢酸 (TFA) で処理することで樹脂からの切り出しを行い、目的とする配列をもつ鎖状ペプチドの合成に成功した。合成したペプチド鎖の CD スペクトル解析を行ったところ、195-300 nm 付近に正または負のコットン効果が見られないことから、合成したペプチド鎖は特定の三次構造を取っていないことが示唆された。

また、蛍光ライブラリーに使用するためのキサンテン骨格をもつ新規蛍光物質の設計と合成を行った。キサンテン誘導体の合成は、N,N-ジエチルアミノフェノールとヨードフタル酸無水物から得られるローダミン誘導体に対し、Heck 反応を行うことで、 $\alpha$ -不飽和エステル誘導体とした。次に、エステル部の還元、及びカルボキシ基の還元を経て、アリルアルコールをもつジオール体とした。得られたジオール体のアニリン部を酸化することで得られるアニリン-N-オキシドに対しトリフラート化反応と 脱離反応を行うことで、アニリンの窒素原子上に存在したアルキル基を除去することに成功した。次に、細胞内でグルタチオン-S-トランスフェラーゼによって選択的に分解されることが知られている 2,4-ジニトロベンゼンスルホニル基を導入した。次にアリルアルコール部を酸性条件下、オゾン酸化条件に附することによってアルデヒドへと変換し、Pinnic 酸化によってカルボン酸誘導体へと変換した。収率に課題を残すもののタンパク質間相互作用阻害剤との連結を可能にする置換基を付与した新規蛍光物質の合成に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 智彦・山口 繭美・横島 聡
2. 発表標題 プロドラック化を志向した新規蛍光プローブの開発研究
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----