

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01014

研究課題名(和文) 高分子間相互作用を制御する合成機能分子を論理的・効率的に創出する方法論の確立

研究課題名(英文) Medicinal chemistry for developing molecules regulating interactions between biological macromolecules

研究代表者

周東 智 (Shuto, Satoshi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70241346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：先に考案したシクロプロパンの構造特性に基づく三次元多様性を鍵とする分子設計法論を展開し、タンパク質間相互作用(PPI)など高分子間相互作用を制御できる合成機能分子の創出法確立を計画した。具体的には、1) PPI制御きる汎用性、ヘリックスミメティクスの創出、2) 環状ペプチドの欠点である細胞膜透過性の改善、3) 標的高親和性環状ペプチド同定方法論であるRaPIDライブラリーへの高機能化、4) ネガマイシンをリードとする高活性リードスルー活性分子創出、5) 高機能核酸の創出に取り組んだ。その結果、本分子設計の有用性を実証し、広範な標的分子に対して有効な論理的創薬方法論を提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

企業とアカデミアの創薬科学は、それぞれ「生産性」と「論理性」を鍵として相互補完的關係であることが望ましく、このような相互補完性をもたらす相乗効果が、創薬の科学としての、また産業としての発展をもたらす。このような観点から、本研究成果は、所望の標的分子に選択的に結合する化合物を偶然(スクリーニング)に依存することなく、効率的かつ論理的に創出する方法論を提示するものであり、アカデミアとしての創薬化学研究として、学術的あるいは社会的にも大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Based on the three-dimensional structural diversity-oriented strategy using characteristic structural features of cyclopropane, medicinal chemistry studies for developing a theoretical method to identify molecules that regulate interaction between biological macromolecules such as proteins or nucleic acids, have been carried out. As the result of these studies, various pharmacologically active compounds regulating macro-biomolecule interactions, such as, α -helix mimetics, membrane-permeable cyclic peptides, were identified. Thus, it was demonstrated that the three-dimensional structural diversity-oriented strategy effectively works for the theoretical development of desired pharmacologically active molecules that regulate interaction between biological macromolecules.

研究分野：創薬化学

キーワード：シクロプロパン 三次元多様性 タンパク質間相互作用 ペプチドミメティクス 環状ペプチド 膜透過性ペプチド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

昨今、X線結晶構造解析やNMR、さらにはクライオ電子顕微鏡など、創薬標的分子の構造解析技術が急速に進歩しているものの、重要な標的分子である受容体やトランスポーター等の膜タンパク質の正確かつ動的な構造解析は、依然として容易ではない。さらに、リガンドの結合に伴い生ずるタンパク質の誘導適合や溶媒和・脱溶媒和、あるいは治療効果に大きく影響するリガンドと標的分子が結合している時間である標的レジデンスタイム等の、論理的医薬分子設計に必須な事象の解析や予測も未だ困難である。このような背景下、標的分子に対して選択的に結合する化合物(ヒットあるいはリード)を同定する方法としては、HTS (High Throughput Screening) や FBB (Fragment-Based Drug Discovery) のような、偶然性に頼るランダムスクリーニングが汎用されている。

一方、医薬の作用点として、タンパク質間相互作用(Protein-Protein Interaction, PPI) のような高分子間相互作用が近年注目されている。抗体に代表されるタンパク質医薬は、PPIを制御することで顕著な薬効を発揮することから、盛んに研究開発されている。しかし、高い製造コスト・経口吸収されない・細胞膜を透過しない等、タンパク質医薬には限界もある。従って、このようなタンパク質医薬の補完的な役割を担う、即ち低コストで経口吸収性・細胞膜透過性を備え、かつPPI等の高分子間相互作用を制御できる合成医薬創出方法論の確立は、喫緊の課題である。化合物の標的分子への親和性(結合の強さ)は、官能基の種類とその空間配置であるファーマコフォアが規定する。従って、配座的自由度が高い生物活性物質の配座を適切に制限すると標的分子親和性と選択性を改善できることを踏まえて、研究代表者は、“三次元的多様性を備えた一連のシクロプロパン配座制限誘導体を系統的に設計・合成することによって、標的分子構造が不明であっても、標的分子結合配座(活性配座、bioactive form)に合致・近似するリガンドを見出せる”との作業仮説を提示した(総説: Chem. Eur. J. 2017, 23, 14394)。本作業仮説の下、一連のシクロプロパン配座制限誘導体の中からヒット・リード化合物をまず同定し(第1段階)、さらに活性配座解析と最適化によって高活性リガンドの創出を実現する(第2段階)という、有機化学に立脚する創薬戦略を立案した。cis/trans-シクロプロパンによる骨格制御に加えて、後述するシクロプロパン歪み及び二等分配座効果を配座制御に併用することが、本戦略の特徴であり利点である。配座制限誘導体合成には4つの立体異性体から成る汎用性シクロプロパンユニットを開発し、例えば以下の成果をあげている。

trans-シクロプロパン骨格を持つペプチド系プロテアソーム阻害剤ベラクトシン A (IC₅₀ = 1440 nM) をプロトタイプとして、三次元多様型配座制限(6種の立体・位置異性体を合成)によって、より高活性な非天然型の cis-シクロプロパン 1 を同定、その構造活性相関に基づく骨格“hopping (置換)”を経て、強力な非ペプチド阻害剤 3 (IC₅₀ = 29 nM) を創出した(図 3A; J. Med. Chem. 2013, 56, 3689; J. Med. Chem. 2013, 56, 5829; Chem. Commun. 2014, 50, 2445; J. Med. Chem. 2014, 57, 2726)。非ペプチドプロテアソーム阻害剤は希少であり、現在担癌モデル動物で高次評価中である(静岡県大・浅井教授との共同研究)。

GABA トランスポーターの4種のサブタイプ(GAT1, GAT 2, GAT 3, BGT1) 中で、機能が不明で選択的阻害剤が皆無であったサブタイプ BGT1 (総説: Madsen, K. et al., Pharmacol. Ther. 2010, 125, 394) に着目し、その阻害剤創出を計画した。GABA の配座をシクロプロパンによって三次元多様に制限し(8種の立体・位置異性体を合成)、所望の BGT1 選択的阻害活性を有する 4 (IC₅₀ = 5.5 μM) を見出した。さらに、シクロプロパン歪み(後述)による側鎖部活性配座解析を経て、初の高選択的 GAT1 阻害剤 6 (IC₅₀ = 0.59 μM) の創製に成功した(図 3B; ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5, 889)。6 はラットにおいて脳内投与で強力な痙攣抑制活性を示した(北大院薬・南教授との共同研究)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の論理的分子設計を PPI 等の高分子間相互作用の制御へと展開することが可能であることを実証し、高分子間相互作用を制御する合成医薬創出の論理的方法論を提示することにある。また、以下に述べる有機合成化学に裏付けられた独自の分子設計戦略が、本研究の独創性に優れる利点である。

シクロプロパンの医薬分子設計における有用性は古くから知られていたが、何れも folded (cis) 型あるいは extended (trans) 型への単純な配座制御への利用に限られる。代表者は、シクロプロパンの特性である“シクロプロパン歪み”(7 項図 11B) および“二等分配座効果”(7 項図 11C) を併用することによる、シクロプロパン誘導体の配座を効果的に制御する新たな配座制御法を考案した。後述するように、実際に3つの効果が複合的に機能し分子全体の配座を作業仮説通りに、統合的に制御できることを明らかにした(Chem. Eur. J., 2017, 23, 3159)。本研究課題では、この独自の分子設計戦略を特色とする創薬化学研究を遂行する。

さらに、本創薬研究に有効利用できる様々な光学活性シクロプロパン類の立体選択的合成功法を開発した(例えば、Org. Lett. 2008, 10, 3571; Org. Lett. 2013, 15, 6202; J. Org. Chem. 2013,

78, 11714; Adv. Synth. Cat. 2015, 357, 1022; Org. Lett. 2016, 18, 48; J. Org. Chem. 2017, 82, 2535)。本課題は、このようなシクロプロパン関連の創薬化学のみならず、有機合成化学における独自の成果があるからこそ立案できたものであり、また、遂行できる。アカデミア薬学に相応しい有機化学を基盤とする論理的創薬化学研究である。

3. 研究の方法

本研究を効率的に遂行可能な有機的な研究体制を既に構築した。代表者と同一研究所所属の渡邊・藤原・武隈とは随時議論可能であり、他の研究者とはメール・スカイプで頻りに情報交換する。さらに、年数回テーマ毎のミーティングを開催し研究の促進を図るとともに、予定通り研究が進まない場合の対策なども含めて議論する。以下に述べるような、高分子間相互作用を制御する分子の創製研究の遂行を通して、上述の「問い」に対する回答を提示するとともに「目的」を達成する。

(1) 汎用性 ヘリックスミメティクスの創出

細胞内情報伝達を担う鍵原理である PPI は医薬の効果的な作用点であり、その相互作用の本質は主に ヘリックス構造が担う。従って、ヘリックス模倣体(ミメティクス)によってその制御が原理的には可能である。しかし、その論理的・合理的な創出は困難であるために、ランダムスクリーニングによるリード同定が汎用されている。ヘリックスにおける相互作用は、同一方向に配向する側鎖アミノ酸配列の i 番目と $i+4$ 、さらに $i+7$ 番目が担うので、ミメティクス創製においては、側鎖官能基を適切な距離・配向に制御することが鍵である。これを踏まえ、三次元多様分子設計に基づき、ヘリックスミメティクス I を既に見出した。本課題においては、I の改良型ミメティクスとしてさらなる精密な配座制御を施したスピロシクロプロパン骨格 scaffold II を設計した。II の最安定構造と典型的なヘリックス構造の重ね合わせると、シクロプロパン歪みと剛直なスピロシクロプロパン骨格によって、ヘリックスの i 番目と $i+4$ に相当する 2 つの側鎖官能基(R1, R2) 間の距離と配向が効果的に制御されていることがわかる。本研究では、scaffold II を活用し、ヘリックス構造が PPI を担う有望な制癌標的である p53-MDM2 相互作用に対する阻害剤を創出する。既に連続する 3 つの不斉点を特徴とする基本骨格の合成法を確立し、ヒット ($IC_{50} = 12 \mu M$) を得ている(昨年度反応と合成の進歩シンポジウムで発表)。具体的には、1) 様々な側鎖官能基(R1, R2) を有するミメティクスを設計・合成(藤原・大学院生)、2) その三次元構造を計算化学・NMR によって解析し、ヘリックス模倣性を検証(広川・竹内)、3) p53-MDM2 相互作用阻害活性を評価(浅井)、4) ヘリックスの $i+7$ に相当する第三の置換基(R3) 導入による最適化(図 5B ミメティクス III; 藤原・大学院生)、5) 顕著な p53-MDM2 相互作用阻害活性を示すミメティクスを選択し、癌細胞増殖抑制活性を評価する(浅井)。以上によって、本 scaffold のヘリックスミメティクスとしての有用性を証明する。

(2) 細胞膜透過性 PPI 制御環状ペプチドの創出

環状ペプチドは、低分子では困難な PPI 制御に有効なことから創薬利用が大いに期待されるものの、その低い細胞膜透過性が活用を制限している(総説; D. P. Fairlie et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 13020)。従って、環状ペプチドの細胞膜透過性の改善は、現在創薬化学における重要課題である。最近の網羅的な解析から、配列に依存する特定の配座(三次元構造)を有する環状ペプチドが細胞膜透過性を有することが報告された(R. S. Lokey, et al., Nat. Chem. Biol. 2011, 7, 810; H. Kessler, et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12125)。これを踏まえ、代表者は、三次元多様型分子設計に基づき多様な三次元構造を有する一連の環状ペプチドを設計・合成することによって、細胞膜透過性環状ペプチドを合理的に創出できるとものと推論し、三次元的多様性を備えた一連のシクロプロパンアミノ酸(CPA) を設計・合成した(第一段階に相当)。これら CPA はシクロプロパン骨格とシクロプロパン歪みによって配座が強固に制御されているので、CPA を環状アミノ酸に組み込むことで、その構造に依存して環状ペプチドの三次元構造を多様に変換(Shape-Shifting)できるものと推論した。実際、多様な配座に制御した 8 種の CPA を導入した環状ペプチドの三次元構造は、CPA に依存して異なる、即ち Shape-Shifting していることが NMR 解析から判明した。さらに、細胞膜透過性も導入した CPA に依存して異なり、特に CPA として cisNfCf を導入した環状ペプチドが、極めて高い細胞膜透過性を有するという初期的な知見を得た(Chem. Eur. J. 2017, 23, 3034)。本研究では、1) 様々な cisCfNf 導入環状ペプチドを合成し(渡邊・大学院生)、2) caco2 細胞系での膜透過性を検証(武隈)、3) 三次元構造を計算化学(広川)及び NMR(竹内)で解析し、4) 細胞膜透過性-三次元構造相関を明らかにする(広川・周東)。さらに、5) 高細胞膜透過性 cisCfNf 導入環状ペプチドに PPI 制御構造を付与した環状ペプチドを設計・合成し(渡邊・大学院生)、その薬理活性を評価する(浅井)。標的分子としては、制癌標的として注目されているシグナル伝達転写因子 STAT3 を予定している(既に浅井が評価系を確立)。以上の結果に基づき、細胞膜透過性 PPI 制御環状ペプチドの合理的創出法の端緒を開く。

4. 研究成果

先に考案したシクロプロパンの構造特性に基づく三次元多様性を鍵とする分子設計法論を展

開し、タンパク質間相互作用（PPI）など高分子間相互作用を制御できる合成機能分子の創出法確立を計画・遂行した。具体的には、1) PPI 制御きる汎用性 ヘリックスミメティクスの創出、2)環状ペプチドの欠点である細胞膜透過性の改善、3) 標的高親和性環状ペプチド同定方法論である RaPID ライブラリーへの高機能化、4) ネガマイシンをリードとする高活性リードスルー活性分子創出、5)高機能核酸の創出に取り組み、顕著な成果を得た。その結果、本分子設計の有用性を実証し、広範な標的分子対して有効な論理的創薬方法論を提示できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Shimizu, T. Saito, H. Aoki-Saito, H. Ikeda, T. Nakakura, H. to Fukuda, S.yota Arai, K.ouichi Fujiwara, Y.asuyo Nakajima, K. Horiguchi, S. Yamada, E. Ishida, T. Hisada, S. Shuto, M. Yamada	4. 巻 36
2. 論文標題 Resolvin E3 ameliorates insulin resistance via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway in adipocytesive	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100053R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Mitsui, M. E. K. Lie, N. Saito, K. Fujiwara1 M. Watanabe, P. Wellendorph, S. Shuto,	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthesis of GABA Analogues Conformationally Restricted by Bicyclo[3.1.0]hexane/hexene or [4.1.0]heptane/heptene backbones as Potent Betaine/GABA Transporter (BGT1) Inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Org. Lett.	6. 最初と最後の頁 4151-4154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c01346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagata, M.; Watanabe, M.; Doi, R.; Uemura, M.; Ochiai, N.; Ichinose, W.; Fujiwara, K.; Kameda, T.; Sato	4. 巻 -
2. 論文標題 Helix-forming aliphatic homo- -peptide foldamers based on the conformational restriction effects of cyclopropane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ldamers based on the conformational restriction effects of cyclopropane.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D20B01715F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S.Arai, K. Fujiwara, M., Kojoma, H. Aoki-Saito, M. Yatomi, T. Saito, Y. Koga, H. Fukuda, M. Watanabe, S. Mstsunaga, T. Hisada, S, Shuto	4. 巻 16
2. 論文標題 Design and synthesis of cyclopropane congeners of resolvin E3, an endogenous pro-resolving lipid mediator, as its stable equivalents.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 10501-10508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c01110.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 周東
2. 発表標題 GABAトランスポーターBGT1 選択的阻害剤の設計と合成
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シイポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 周東 智	4. 発行年 2022年
2. 出版社 京都弘川書店	5. 総ページ数 341
3. 書名 有機医薬分子論 2.0	

〔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
研究分担者	渡邊 瑞貴 (MIZUKI WATANABE) (20507173)	北海道大学・薬学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	小松 康雄 (YASUO KOMATSU) (30271670)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長 (82626)	
研究分担者	藤原 広一 (KOICHI FUJIWARA) (40837853)	北海道大学・薬学研究院・助教 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	後藤 佑樹 (YUKI GOTO) (70570604)	東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・准教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関