

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20719

研究課題名（和文）大規模ライブラリー構築とAIを用いた解析によるPPI阻害ペプチド探索技術の創出

研究課題名（英文）Discovery of PPI inhibitory peptides through large compound library and AI

研究代表者

高田 悠里（Takada, Yuri）

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20902357

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：リシン特異的脱メチル化酵素1(LSD1)は転写因子SNAIL1と相互作用し、その相互作用阻害は抗がん活性を示すと期待されている。そこで本研究では、SNAIL1の配列を基盤とした新規LSD1/SNAIL1相互作用阻害ペプチドの創出を目指した。SNAIL1のN末端からの配列を基盤とした構成残基数の異なるペプチドの設計・合成・LSD1阻害活性評価により、LSD1阻害に必要な最小限のアミノ酸残基数を見出した。さらに、不可逆的阻害活性をもたらすヒドラジン構造を導入した非天然アミノ酸含有ペプチドを創製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中分子量のペプチド化合物は、タンパク質間相互作用(PPI)の広い作用面に対して特異的かつ強力に相互作用することができるため、PPIの制御に有用である。しかし、制限や課題の多さゆえ、創薬シーズとなるペプチド化合物を見出すのは困難であり、創薬シーズとなるPPI阻害ペプチド化合物を効率的に探索する基盤技術の確立は重要な意義を持つ。

本研究では、LSD1/SNAIL1を標的PPIとし、研究に着手した。SNAIL1のN末端からの配列を基盤とし、構成残基数と側鎖構造を検討し、新規LSD1阻害ペプチドを創製した。

研究成果の概要（英文）：Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) interacts with the transcription factor SNAIL1, and it is expected that inhibiting this interaction will exhibit anticancer activity. In this study, we aimed to discover a novel LSD1/SNAIL1 interaction inhibitory peptide based on the SNAIL1 sequence.

We designed, synthesized, and evaluated the peptides with varying numbers of residues based on the N-terminal sequence of SNAIL1. As a result, we identified the minimum number of amino acid residues required for LSD1 inhibition. Additionally, we discovered a peptide containing non-natural amino acid that introduced a hydrazine structure, leading to irreversible inhibitory activity.

研究分野：有機化学、創薬化学

キーワード：有機化学 固相合成 ペプチド 化合物ライブラリー 構造活性相関 人工知能 タンパク質間相互作用 創薬

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中分子量のペプチド化合物は、タンパク質間相互作用(**protein-protein interaction, PPI**)の広い作用面に対して特異的かつ強力に相互作用することができるため、PPIの制御に有用である。しかしながら、制限や課題の多さゆえ、創薬シーズとなるペプチド化合物を見出すのは非常に困難であり、創薬シーズとなる **PPI 阻害ペプチド**化合物を効率的に探索する基盤技術を確立することは非常に重要な意義を持つ。

2. 研究の目的

タンパク質間相互作用阻害ペプチドの効率的な創出基盤技術を確立することを目的とし、この目的を、大規模なライブラリー戦略と人工知能を用いた解析を組み合わせた独自の革新的ペプチド創製法により達成することを考案した。

本研究では、エピジェネティクス複合体の特定の **PPI** を阻害する新規ペプチドを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

エピジェネティクス複合体における標的 **PPI** は、**LSD1/SNAIL1** とし、**LSD1/SNAIL1** 相互作用阻害ペプチドを創出することを目的に研究に着手した。

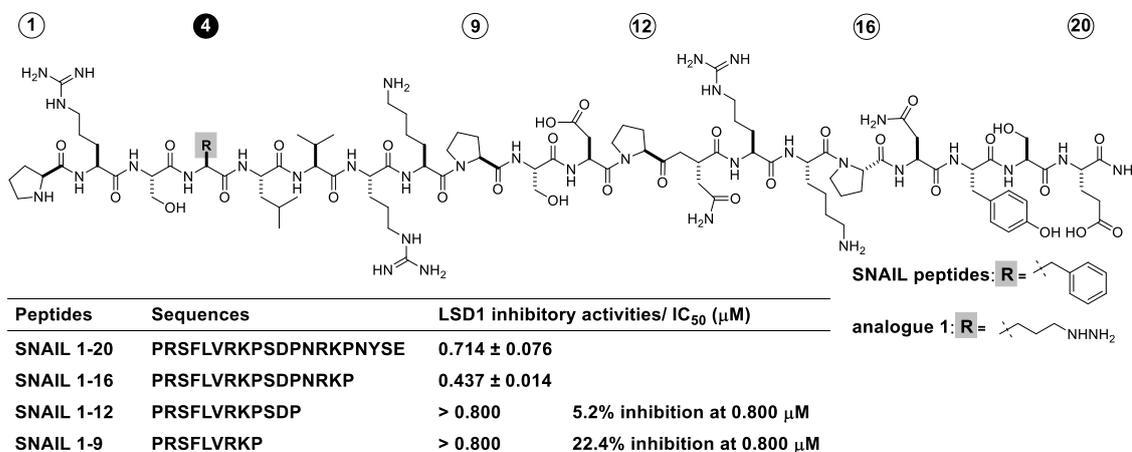
【**LSD1/SNAIL1** 相互作用を標的とした **PPI** 阻害ペプチドの開発】

リシン特異的脱メチル化酵素 1(**LSD1**)は転写因子 **SNAIL1** と相互作用し、その相互作用阻害は抗がん活性を示すと期待されている<sup>[1,2]</sup>。所属研究室では、**SNAIL1** の N 末端から 20 残基の構造を持ち、その 4 番目のフェニルアラニンを非天然のアミノ酸残基に変換したペプチド **1** (**Figure 1**)が弱いながらも **LSD1/SNAIL1** 相互作用を阻害することを既に見出している<sup>[2]</sup>。しかしながら、**LSD1/SNAIL1** 選択性や膜透過性の向上、構成残基数の最適化、各側鎖の重要性に関する網羅的知見・検討は十分ではなく、より高活性なペプチド性阻害薬開発には課題が多い。

本研究では、**SNAIL1** の N 末端からの配列を基盤とし、構成残基数と側鎖構造を種々検討したペプチド化合物を設計・合成し、その **LSD1** 阻害活性を評価することで、新規 **LSD1** 阻害ペプチドを創製した。

4. 研究成果

まず、活性に必要な最小限のアミノ酸残基数を探索するために、**SNAIL1** の N 末端から 20 残基の配列からなるペプチド(**SNAIL1 1-20**)と、16 残基、12 残基、9 残基の配列からなるペプチド **SNAIL1 1-16**、**SNAIL1 1-12**、**SNAIL1 1-9** を Fmoc 固相合成法により合成した。それらの **LSD1** 阻害活性を評価した結果、**SNAIL1 1-16** が最も高い **LSD1** 阻害活性を示すことがわかった(**Figure 1**, **SNAIL1 1-16**:  $IC_{50} = 0.437 \mu M$ )。そこで、**SNAIL1-16** を基盤に、構造展開することとした。



**Figure 1.** Structures of **SNAIL** peptides and analogue 1, and their **LSD1** inhibitory activities.

続いて、**SNAIL1 1-16** の第 4 残基に、不可逆的阻害活性をもたらすヒドラジン構造を導入した非天然アミノ酸含有ペプチド **P1** を設計した。ペプチド **P1** の合成にあたり、側鎖のヒドラジノ基を Boc 基で保護した Fmoc アミノ酸をグルタミン酸より 7 段階で合成した。合成した Fmoc アミノ酸をモノマーとして使い、Fmoc ペプチド合成法を適用することで、ペプチド **P1** を合成し、その LSD1 阻害活性を評価した。その結果、ペプチド **P1** は **SNAIL1 1-16** と比して、同程度の LSD1 阻害活性を示し(Figure 2)、**SNAIL1 1-16** と同程度の活性を維持し、不可逆的な LSD1 阻害ペプチド **P1** を創製した。

次に、**SNAIL1 1-16** の側鎖構造の構造展開を行うこととした。LSD1 の活性部位近傍で相互作用すると考えられる第 5 残基のロイシン残基をバリン残基に置換した **P2**、フェニルアラニン残基に置換した **P3** を設計・合成し、その LSD1 阻害活性を評価した。その結果、LSD1 阻害活性は低下したものの、ペプチド **P2**、**P3** が LSD1 阻害活性を示すことを見出した(Figure 2)。

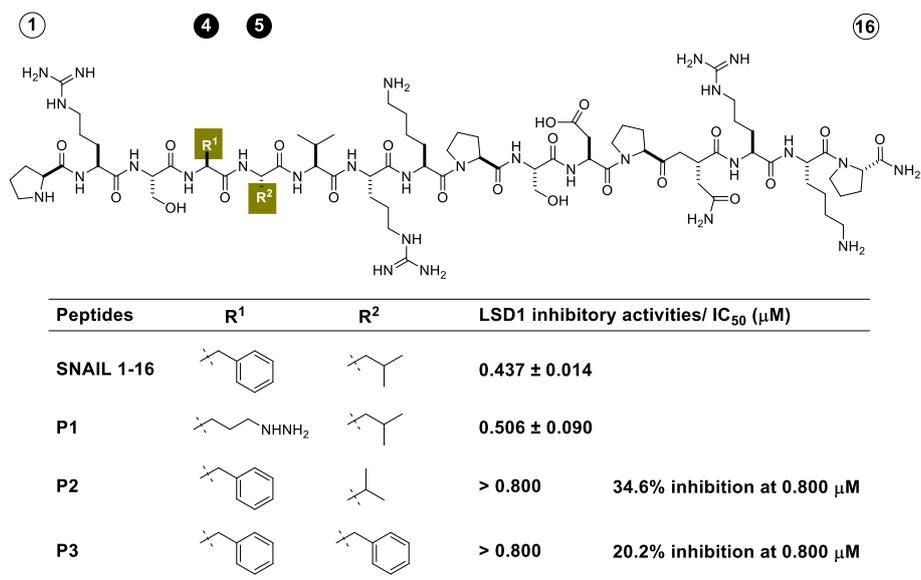


Figure 2. Structures of **SNAIL 1-16**, **P1**, **P2**, and **P3**, and their LSD1 inhibitory activities.

また、C 末端構造やその他各側鎖構造を変換したペプチド化合物の設計・合成、LSD1 阻害活性評価を行った。得られた結果を基に、ライブラリーの設計・合成・スクリーニングを進めている。今後、得られた大規模構造活性相関研究の結果を基に人工知能を用いた解析を進めていく予定である。

#### 【参考文献】

- [1] (a) Zhou, B. P. et al. *EMBO J.* **2010**, *29*, 1803. (b) Lu, J. et al. *Oncogene* **2010**, *29*, 4896.  
 [2] Suzuki, T. et al. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1531.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada Yuri, Yamashita Yasunobu, Itoh Yukihiro, Suzuki Takayoshi	4. 巻 80
2. 論文標題 Medicinal Chemistry Research on Targeting Epigenetic Complexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 664 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.80.664	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 Ota Yosuke, Itoh Yukihiro, Kurohara Takashi, Singh Ritesh, Elboray Elghareeb E., Hu Chenliang, Zamani Farzad, Mukherjee Anirban, Takada Yuri, Yamashita Yasunobu, Morita Mie, Horinaka Mano, Sowa Yoshihiro, Masuda Mitsuharu, Sakai Toshiyuki, Suzuki Takayoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Cancer-Cell-Selective Targeting by Arylcyclopropylamine-Vorinostat Conjugates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1568 ~ 1573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.2c00126	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 該当する

1. 著者名 Chotitumnaevee Jiranan, Yamashita Yasunobu, Takahashi Yukari, Takada Yuri, Iida Tetsuya, Oba Makoto, Itoh Yukihiro, Suzuki Takayoshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Selective degradation of histone deacetylase 8 mediated by a proteolysis targeting chimera (PROTAC)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 4635 ~ 4638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2CC00272H	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 Itoh Yukihiro, Takada Yuri, Yamashita Yasunobu, Suzuki Takayoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Recent progress on small molecules targeting epigenetic complexes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 102130 ~ 102130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2022.102130	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 Prakash Muthuraj、Itoh Yukihiro、Fujiwara Yoshie、Takahashi Yukari、Takada Yuri、Mellini Paolo、Elboray Elghareeb E.、Terao Mitsuhiro、Yamashita Yasunobu、Yamamoto Chika、Yamaguchi Takao、Kotoku Masayuki、Kitao Yuki、Singh Ritesh、Roy Rohini、Obika Satoshi、Oba Makoto、Wang Dan Ohtan、Suzuki Takayoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 Identification of Potent and Selective Inhibitors of Fat Mass Obesity-Associated Protein Using a Fragment-Merging Approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 15810 ~ 15824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c01107	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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高田悠里、Muthuraj Prakash、伊藤幸裕、藤原芳江、高橋ゆかり、Paolo Mellini、Elghareeb E. Elboray、寺尾允太、山下泰信、山本知佳、山口卓男、Ritesh Singh、小比賀聡、大庭誠、王丹、鈴木孝禎
2. 発表標題 RNA脱メチル化酵素FTO阻害薬の創製
3. 学会等名 第39 回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chenliang Hu、Yosuke Ota、Yukihiro Itoh、Farzad Zamani、Anirban Mukherjee、Yuri Takada、Yasunobu Yamashita、Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of optically pure phenylcyclopropylamine-drug conjugates targeting LSD1
3. 学会等名 第39 回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺尾允太、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 SBDD によるKDM5B 選択的阻害薬の創製研究
3. 学会等名 第39 回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下泰信、Jiranan Chotitumnavee、高橋ゆかり、高田悠里、飯田哲也、大庭誠、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 HDAC8 選択的分解誘導薬の創製とその生物学的評価
3. 学会等名 第39 回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島大和、高田悠里、山下泰信、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 創薬、ケミカルバイオロジー研究を指向したスクアラミドの反応性検証
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎、黒原崇、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 二核ビスマス(III)錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎、黒原崇、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 RNA創薬への応用を志向したビスマス(III)錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 第20回次世代を担う有機化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎、黒原崇、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 ビスマス(III)錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花谷優太郎、黒原崇、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 二核ビスマス(III)錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島大和、高田悠里、山下泰信、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 創薬への応用を指向したスクアラミドの反応性検証
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺尾允太、山下泰信、高田悠里、伊藤幸裕、鈴木孝禎
2. 発表標題 細胞評価系での活性向上を目指したKDM5B阻害薬の創製研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田悠里、Muthuraj Prakash、伊藤幸裕、藤原芳江、高橋ゆかり、Paolo Mellini、Elghareeb E. Elboray、寺尾允太、山下泰信、山本知佳、山口卓男、Ritesh Singh、小比賀聡、大庭誠、王丹、鈴木孝禎
2. 発表標題 Identification of Potent and Selective Inhibitors of Fat Mass Obesity-Associated Protein
3. 学会等名 第3回大津会議合同研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chenliang Hu、Yosuke Ota、Yukihiro Itoh、Farzad Zamani、Anirban Mukherjee、Yuri Takada、Yasunobu Yamashita、Takayoshi Suzuki
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of optically pure phenylcyclopropylamine-drug conjugates targeting LSD1
3. 学会等名 第26回産研国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花谷 優太郎、黒原 崇、山下 泰信、高田 悠里、伊藤 幸裕、鈴木 孝禎
2. 発表標題 RNA創薬を志向した金属錯体型RNA分解分子の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------