

非天然アミノ酸によるボトムアップ型ペプチドPPI創薬

九州大学大学院薬学研究院環境調和創薬化学分野

矢崎 亮

【背景】

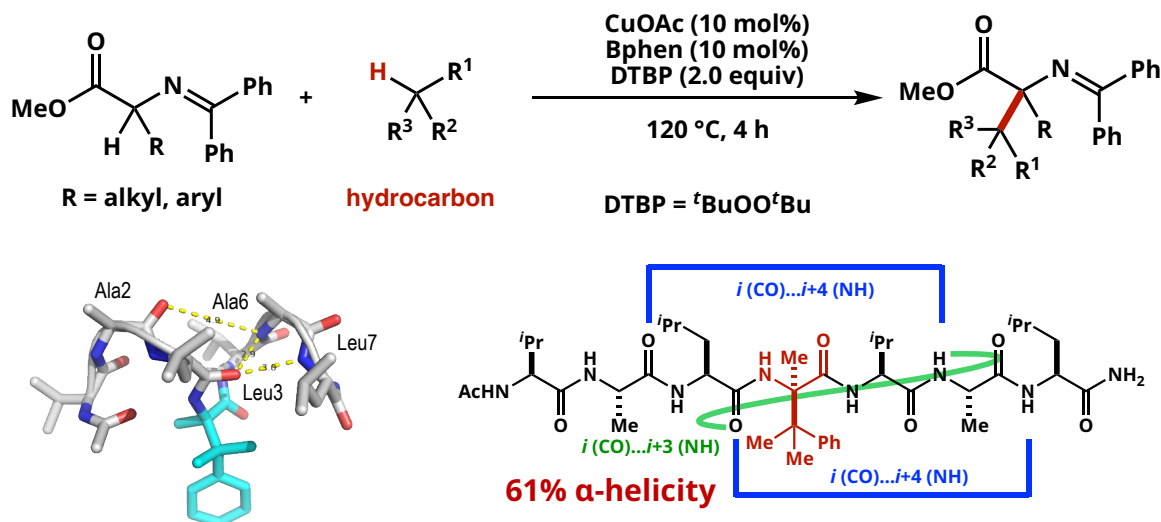
PPI（蛋白質間相互作用）は、創薬ターゲットとして未だ発展途上の研究分野で、次世代医薬品のターゲットとして近年注目されている。特に、非天然 α -アミノ酸を有する特殊ペプチドは、標的タンパクへの親和性の高さや、ペプチダーゼ耐性など創薬研究において注目を集めている。特殊ペプチドの特徴として、コンフォメーションがリジッドな環状構造である点や、*N*-メチル化アミノ酸を含有している点が挙げられる。これらの構造的特徴により、代謝安定性の向上や標的部位に対する結合能の向上がもたらされる。一方で、膜透過性が低く、*in vivo*で活性を示しにくいなどの課題が残されており、新たなコンセプトを基盤としたペプチド合成技術の開発が強く望まれている。本研究では、独自の非天然アミノ酸を用いたPPI創薬研究として、(1) 非天然 α -アミノ酸合成法の開発とペプチドへの導入と機能評価、(2) SARS-CoV-2 Sタンパク/hACE2のPPI阻害ペプチドの開発、(3) MDM2/p53のPPI阻害ペプチドの開発を目的とした。

【実験・結果】

(1) 非天然 α -アミノ酸合成法の開発とペプチドへの導入と機能評価

ラジカル型反応は、一般に律速課程が電子移動であるため反応速度が大きく、また立体障害の影響を受けにくい。高度に sp^3 炭素が密集した分子の構築法として最適である。我々は独自の安定ラジカルプラットフォーム技術を活用することで、 α,β -連続四置換炭素を有する非天然型 α -アミノ酸を世界で初めて提供可能な独自技術の開発に成功している¹。本反応では、アミノ酸 Schiff 塩基とハロゲン化アルキル試薬の一電子移動 (SET) が銅触媒によって進行することで、通常では困難なラジカル種同士のクロスカップリング選択的な反応を実現している。一方で、銅触媒を介した SET 機構であるために、還元可能なハロゲン化アルキル試薬に制限がある点や、ペプチド合成への応用が困難である点において改善の余地が残されていた。今回新たに、構造多様性に富んだアルキル化試薬として炭化水素に着目し、アミノ酸 Schiff 塩基を用いた反応では初の脱水素型の酸化的クロスカップリング反応の開発を行なった。種々検討を行なったところ、銅触媒存在下、酸化剤として DTBP (di-tert-butyl peroxide) を用いることで、アミノ酸 Schiff 塩基とクメンをはじめとした炭化水素との連続四置換炭素構築型のクロスカップリング反応が円滑に進行し、種々の立体障害の大きな非天然 α -アミノ酸誘導体を得ることに成功した (Scheme 1 上部)²。

Scheme 1. 触媒的脱水素型クロスカップリング反応とヘリックス安定化効果



本反応はグラムスケールにおいても問題なく進行し、ペプチド固相合成で汎用される Fmoc 保護されたアミノ酸をマルチグラムスケールで提供可能であった。得られた生成物は、数工程を経ることで C 末端および N 末端どちらにもペプチド鎖を伸長することにも成功した。また、円偏光二色性スペクトルと *in silico* 構造解析を用いて、非天然 α -アミノ酸がペプチドの α -ヘリックス構造を安定化することを世界に先駆けて明らかとした (Scheme 1 下部)。さらに非天然アミノ酸として重水素化アミノ酸や不飽和アミノ酸の独自合成法の開発にも成功した³⁻⁵。

(2) SARS-CoV-2 S タンパク/hACE2 の PPI 阻害ペプチドの開発

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、細胞表面上のアンギオテンシン転換酵素 (hACE2) を細胞に接着する受容体として用いていることが報告されている。特に hACE2 の N 末端ヘリックスの 19-50 残基のペプチドが SARS-CoV-2 spike (S タンパク) との相互作用に重要であることが確認されている。本研究では、この S タンパク/hACE2 の PPI を標的とした中分子ペプチドの開発を行なった。ペプチドのヘリシティと *in silico* 構造解析を行うことで、非天然アミノ酸導入位置の絞り込みを行い、さらに表面プラズモン共鳴法 (SPR) により各ペプチドの S タンパク親和性の評価を行った。その結果、天然の hACE2 ペプチドと比較して、非天然アミノ酸を含むペプチドが高い α -ヘリシティ及び結合親和性を示すことを見出した。特筆すべきことに、これまで高いヘリックス安定化効果のため汎用されている Aib (2-アミノイソ酪酸) と比較しても、高いヘリックス安定化効果と結合親和性を示すことも明らかとし、今回合成可能となった独自の非天然アミノ酸の有用性を確認することができた。

(3) MDM2/p53 の PPI 阻害ペプチドの開発

p53 遺伝子は、ヒトのがんの約半数で異常を認める代表的ながん抑制遺伝子である。MDM2 は p53 を制御する主要なユビキチンリガーゼで、MDM2 の発現増加等の異常は、p53 の機能を著しく低下、持続的ながん細胞の増殖を可能とする。そのため、p53/MDM2 を標的として PPI 創薬研究は盛んに行われている。これまでに MDM2 に高い親和性を示す小分子 (Nutlin-3 など) が報告されているものの、副作用のため実用化には至っていない。そこで副作用が少なく、かつ細胞膜透過性にすぐれた中分子ペプチドの開発が強く望まれている。MDM2/p53 複合体は、p53 の 2.5 周期のヘリックス構造を有する 17-29 アミノ酸残基と相互作用している (Figure 2)。中心的な疎水性相互作用として、Phe19、Trp23、Leu26 が挙げられる。既存の研究は、この 3 つのアミノ酸残基を変えずに、その他のアミノ酸残基を変更することで、親和性向上を試みている。本研究では、相互作用に重要なアミノ酸残基を、疎水性と立立体障害の大きな非天然アミノ酸に置換することで、疎水性相互作用の増強とヘリックス安定化により親和性向上が可能ではないかと考えた。MDM2/p53 複合体の X 線結晶構造解析とこれまでの報告をもとに、非天然アミノ酸に置換するアプローチを採用し検討を行ったところ、適切な非天然アミノ酸を導入することで、高い結合親和性を示すことがわかった。また、マウス肝ミクロソームを用いて代謝安定性試験を行なったところ、非天然アミノ酸導入することで顕著な代謝安定性の向上を確認することができた。さらに、細胞膜透過性の向上も確認されており、今後はペプチドの体内動態を中心に、*in vivo* での活性試験を中心に検討を行う。

【まとめ・今後の展望】

本研究では、独自の非天然アミノ酸合成法の開発とペプチド導入による機能評価を行うことで高いヘリックス安定化効果を明らかとした。さらに独自非天然アミノ酸を用いることで、SARS-CoV-2 S タンパク/hACE2 と MDM2/p53 の PPI を標的とした中分子ペプチドの開発を行い、天然のペプチド配列と比較して、高いヘリシティ・結合親和性を示すペプチドを見出すことに成功した。さらに非天然アミノ酸を導入することで、薬物動態としての代謝安定性や細胞膜透過性の向上を確認することができた。

今後は独自のアミノ酸を用いた更なる構造最適化や、*in vivo* での活性を示すための薬物動態試験などを中心に検討を行う。また、他の疾患への応用を行うため構造情報が付与されたペプチドライブラリーの拡充を進める。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました九州大学大学院薬学研究院の大嶋孝志教授にこの場を借

りて御礼申し上げます。また終始有益な御助言をいただきました共同研究者に深謝いたします。熱心に研究に取り組んでくれた学生の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究実施にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。

【参考文献】

1. Matsumoto, Y.; Sawamura, J.; Murata, Y.; Nishikata, T.; Yazaki, R.; Ohshima, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 8498.
2. Tsuji, T.; Hashiguchi, K.; Yoshida, M.; Ikeda, T.; Koga, Y.; Honda, Y.; Tanaka, T.; Re, S.; Mizoguchi, K.; Takahashi, D.; Yazaki, R.; Ohshima, T. *Nat. Synth.* **2022**, *1*, 304.
3. Tanaka, T.; Koga, Y.; Honda, Y.; Tsuruta, A.; Matsunaga, N.; Koyanagi, S.; Ohdo, S.; Yazaki, R.; Ohshima, T. *Nat. Synth.* **2022**, *1*, 824-830.
4. Ikeda, T.; Ochiishi, H.; Yoshida, M.; Yazaki, R.; Ohshima, T. *Org. Lett.* **2022**, *24*, 369-373.
5. Sawamura, J.; Ieiri, D.; Yazaki, R.; Ohshima, T. *Precis. Chem.* **2023**, DOI: 10.1021/prechem.3c00048