

研究報告書
令和2年度：A課題

令和4年4月1日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 国立医薬品食品衛生研究所

住所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26

研究者氏名 出水 庸介

(研究課題)

がん関連転写因子を標的とした中分子ペプチド阻害剤の開発

令和3年2月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【目的】

転写因子の活性化には、コアクチベータのヘリカルモチーフを介した転写因子への結合が重要であることが知られている。本研究では、これらの相互作用（Protein-Protein Interaction, PPI）を阻害できる非天然型アミノ酸を含むヘリカルペプチドの開発を目指し、本年度はエストロゲン受容体 α （ER α ）をモデルタンパク質として選択した。

さらに、ヘリカルペプチドを利用したタンパク質分解誘導剤（PROTAC）の開発を目指した。PROTACは、生体内に備わるユビキチン-プロテアソームシステム（ubiquitin-proteasome system: UPS）を利用して任意のタンパク質を分解できる有機分子であり、新たな医薬品モダリティとして期待されている¹⁾。PROTACは、標的タンパク質リガンド、ユビキチンリガーゼ（E3リガーゼ）リガンド、それと両リガンドをつなぐリンカーから構成される。通常のPROTACは低分子リガンドを利用して設計されるが、リガンド結合部位が内部に埋もれているタンパク質やリガンドが存在しないタンパク質に対しては、合理的な設計が困難である。一方で、PPI阻害ペプチドは、標的タンパク質表面に強く結合し、その機能を制御できるため、これらのタンパク質に対してもPROTACの設計が可能であると考えた。

【方法】

筆者らは、核内受容体に結合するコアクチベータのヘリカルモチーフ（LXXLL配列）を持つ天然型ペプチド **PREM3-R7** が、ER α の転写活性化を阻害できること報告している²⁾。そこで、

PREM3-R7 にヘリカル構造を安定化できる非天然型アミノ酸（ステーブル構造）を導入したステーブルペプチド **stPERML-R7** を設計することで、阻害活性の向上と酵素分解耐性の向上を目指した。さらに開発したステーブルペプチドに E3 リガーゼリガンド（IAP リガンド **LCL161**）を結合させたペプチド型分解誘導剤 **LCL-stPERML-R7** を設計-合成した。

各ペプチドの合成は、マイクロ波照射を利用した固相法により効率的に行い、逆相 HPLC で精製した。ペプチドの ER α 転写阻害活性は Luc アッセイにより、ER α 分解活性評価はウエスタンブロットにより評価した（MCF-7 細胞）。

【結果と考察】

PREM3-R7 にステーブル構造を導入することで、ヘリカル構造が安定化すること、さらに、転写阻害活性及び、酵素分解耐性の向上を達成できた。

MCF-7 細胞を用いた ER α 分解活性評価の結果、**LCL-stPERML-R7** は濃度依存的に ER α タンパク質を分解することが明らかとなった。また ER α の分解には、UPS が関与していることが示唆された⁴⁾。

本コンセプトは他のペプチド型 PROTAC の開発にも有用であり、筆者らは、既存の小分子では標的とすることが難しい NOTCH を標的としたペプチド型 PROTAC の創出にも成功している³⁾。ペプチド型 PROTAC が、中分子ペプチド医薬品開発や生命科学研究の発展のためのケミカルツールとして利用されることを期待したい。

【参考論文】

1. Crews, C. M. *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 174, 138–144 (2017).
2. Demizu, Y. *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 25, 1921–1924 (2014).
3. Demizu, Y. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 4985–4988 (2017).

【発表論文】

4. Peptide stapling improves the sustainability of a peptide-based chimeric molecule that induce targeted protein degradation
H. Yokoo,[#] N. Ohoka,[#] M. Takyo, T. Ito, K. Tsuchiya, T. Kurohara, K. Fukuhara, T. Inoue, M. Naito, Y. Demizu* ([#]*These authors equally contributed to this work.*)
Int. J. Mol. Sci., 22, 8772 (2021).

【謝辞】

本研究の遂行に多大なるご協力を賜りました、国立医薬品食品衛生研究所の大岡伸通博士、横尾英知博士、東京大学の内藤幹彦教授に感謝申し上げます。また、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。