

審査の結果の要旨

氏 名 蘇 奥 澤

蘇 奥澤は「Generation of Non-Naturally Occurring Helical Molecules Which Can Interfere with p53-MDM2 / MDMX Protein-Protein Interactions (p53-MDM2 / MDMX 間相互作用を阻害する非天然ヘリックス分子の創製)」を論文題目とし、以下の研究をおこなった。

以前当教室では、コンホメーションを制限した非天然アミノ酸の一種である二環性β-プロリン (Azabicyclo[2.2.1]heptane carboxylic acid, **Abh**) のオリゴペプチドが all-シスアミド体または all-トランスアミド体を取り、安定な非天然型ヘリックス構造を構築できることを報告した (*tAbh*, **Figure 1**)。天然のα-アミノ酸ペプチドと異なり、これらのヘリックスは分子内水素結合を形成せず、溶媒などの環境によらずに最小単位である2量体からヘリックス構造をとる。そこで、この非天然型ヘリックス構造を持つオリゴマーがタンパク質と相互作用可能かどうかを調べることにした。

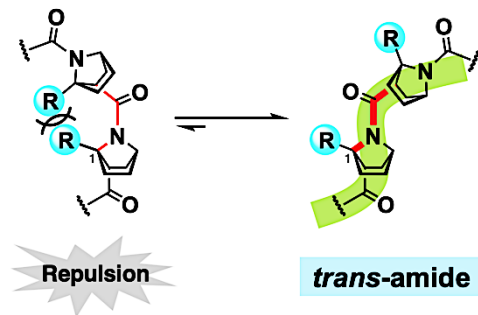


Figure 1. *Trans*-amide-type helical structures are formed in *C1*-substituted bicyclic β-proline (*trans*-type **Abh**, short for *tAbh*) oligomers.

p53-MDM2 および p53-MDMX 相互作用は細胞のがん化や悪性化に関わる重要なタンパク質-タンパク質相互作用であり、MDM2 および MDMX は p53 の α-ヘリックス構造を認識する。本研究では、MDM2 / MDMX と結合し、p53 との相互作用を阻害する非天然型ヘリックス分子を見出し、活性を最適化することを目的とした。

1. **Abh** 誘導体の p53-MDM2/MDMX アンタゴニスト活性の初期評価

当研究室の二環性β-プロリン化合物ライブラリーから 16 化合物を選び (**Figure 2**)、ELISA 法により化合物の阻害作用を調べた。その結果、トランスアミド型アミノ酸 (*tAbh*) の 3 残基ペプチドである **C-3** のみが 30 μM, 100 μM の両濃度で p53 - MDM2 相互作用の阻害を示すことが分かった (**Figure 3 左**)。p53-MDMX 相互作用阻害活性について

は、16化合物はいずれも MDM2 より阻害活性が低くなったが、**C-3** は依然として最も強い活性を示した (**Figure 3** 右)。単残基アミノ酸誘導体や2残基ペプチドなど短いオリゴマーは活性が低かった。また、**A-1** は **C-3** よりも低活性であったが、これは **A-1** がヘリックス構造の維持に重要な橋頭位置換基を持たないことに起因すると考えられる。これらの結果は、非天然型のトランスアミド体ヘリックスを持つ3残基ペプチド

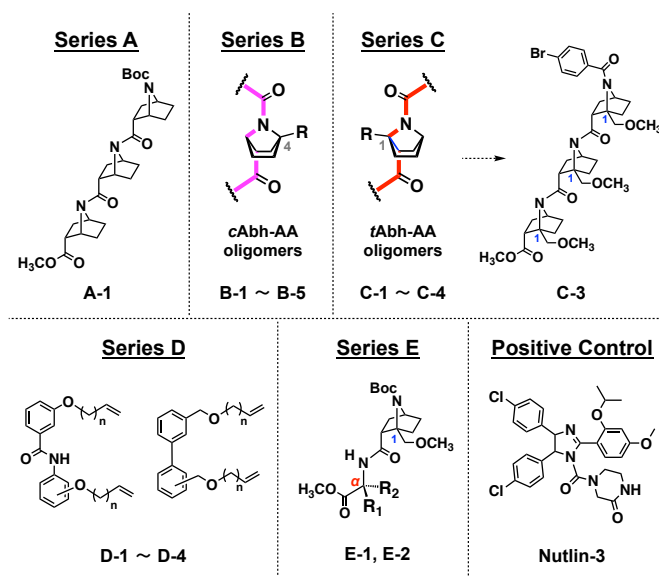


Figure 2. 16 compounds divided into 5 series: (A) non-bridgehead-substituted **Abh** homooligomer, (B) **cAbh** homooligomers, (C) **tAbh** homooligomers, (D) benzamide and biphenyl foldamers and (E) α/β hybrid dipeptides.

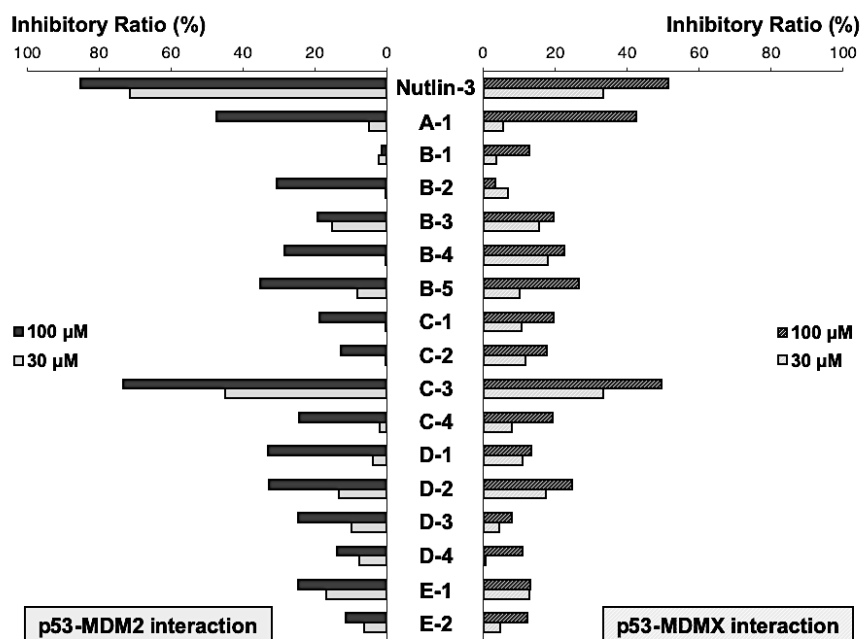


Figure 3. Inhibitory activities of tested compounds at 30 μM and 100 μM . Positive control Nutlin-3 was tested at 1 μM (grey bar) and 3 μM (black bar) on p53-MDM2 interaction (left), and at 10 μM (meshed grey bar) and 30 μM (meshed black bar) on p53-MDMX interaction (right).

が、天然の15残基ペプチドを模倣可能であることを示唆している。

2. tAbh ホモオリゴマーの鎖長依存性

次にオリゴペプチドの鎖長依存性を調べるため、N 末に p-ブロモベンゾイル基をもつ 2 残基ペプチド (C-5)、3 残基ペプチド (C-3)、4 残基ペプチド (C-6) を合成し阻害活性を評価したところ、4 残基ペプチド (C-6) が最も強い阻害活性を示した (Figure 4, 5)。

一方、2 残基ペプチド (C-5) は 3 残基ペプチド (C-3) と比較して活性が低下し、30 μM および 100 μM で低活性にとどまった。

これらの結果から、少なくとも 3 残基が MDM2/MDMX との結合に必要であることが示された。

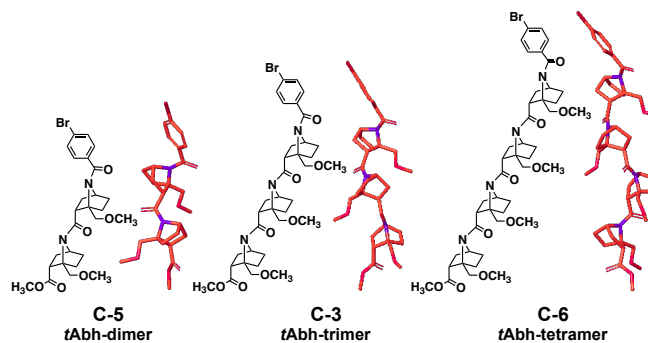


Figure 4. Trans-amide type (*tAbh*) homooligomers.

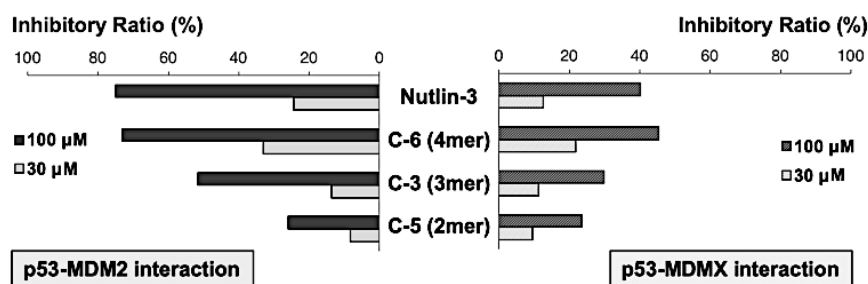


Figure 5. Inhibitory activities of tested compounds at 30 μM and 100 μM . Positive control Nutlin-3 was tested at 1 μM (grey bar) and 3 μM (black bar) on p53-MDM2 interaction (left), and at 10 μM (meshed grey bar) and 30 μM (meshed black bar) on p53-MDMX interaction (right).

3. 3 残基ペプチドの構造活性相関

ドッキングシミュレーションや分子動力学計算などの計算手法を利用して、C-3 と MDM2 / MDMX タンパク質の取り得る結合ポーズを提案した。さらに、計算によりタンパク質との結合を安定化する N 末端置換基・C 末端置換基・橋頭位側鎖を探索し、置換基を変化させた化合物を各種合成し構造活性相関を解明するとともに、活性を最適化した。その結果、N 末端に芳香環を持つアシル基を導入すると π - π 相互作用により MDM2 の疎水ポケットとの結合が強まることを解明した。また、C 末端にカルボキシル基を持つ化合物が阻害活性と水溶性の両方の点で有利であることを発見した。

以上の業績は、薬学分野における非天然型のアミノ酸ペプチドの有用性を示すものであり、有機化学の進展に寄与するものである。またメディシナルケミストリーに利用可能な新たな分子構造の提案につながり薬科学にも貢献するものである。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。