

博士論文

**A study on conformationally constrained peptoid with
alanyl backbone toward development of inhibitors of
intracellular protein-protein interactions**

(細胞内タンパク質間相互作用阻害剤の開発に向けた配座制御
された主鎖アラニン型ペプトイドの研究)

福田 泰啓

第1章. 緒言

タンパク質間相互作用 (Protein-protein interactions: PPIs) は、幅広い細胞内シグナル伝達に関わっており、また、PPIの異常は様々な疾患の原因となっている。そのため、生体機能の理解や疾病治療に向けて、細胞内PPIを制御・阻害可能な分子の開発は重要である。

細胞内PPIを阻害する上では、高い細胞膜透過性を有し、タンパク質の広い表面を認識できる分子が必要となる。ペプチドは、秩序立った2次構造によって形成される広い相互作用面により、高い親和性と特異性でタンパク質表面を認識することができる。このため、ペプチドは細胞内PPIを阻害可能な分子として注目されてきた。しかし、細胞膜透過性の低さが課題となり、ペプチドの細胞内PPI阻害剤としての応用は限られている。

側鎖を α 炭素上ではなくアミド窒素上に有する、オリゴN置換グリシン (oligo(N-substituted glycine): oligo-NSG、**Figure 1a**) は、ペプチドと呼ばれ¹、N置換アミド構造に由来するプロテアーゼ耐性の高さ^{2,3}と細胞膜透過性の高さから^{2,3}、ペプチドに代わり、細胞内PPIを阻害できる分子候補として注目されている。しかし、oligo-NSGは一部の例外^{4,5}を除いてタンパク質に対する結合親和性が低く、細胞内でPPIを阻害できるoligo-NSGの報告例は限られている。これは、oligo-NSGの分子骨格が柔軟であるために、タンパク質との相互作用がエントロピー的に不利となるためだと考えられる。よって、水中で特定の立体構造を剛直に形成するペプチドを開発できれば、プロテアーゼ耐性と細胞膜透過性、タンパク質への高い結合親和性を兼ね備えた分子骨格を実現し、細胞内PPIを阻害可能な基盤分子骨格の創出につながると考えられる。

立体配座が制限されたペプチドの実現に向け、oligo-NSGの主鎖 α 炭素上にメチル基を導入したオリゴN置換アラニン (oligo(N-substituted alanine): oligo-NSA、**Figure 1a**) が提唱された⁶。Oligo-NSAは、 α 炭素上へのメチル基の導入によって生じる擬似的1,3アリル歪みにより主鎖二面角の回転が制限され、特定の立体構造を剛直に形成すると予測される (**Figure 1b**)。しかし、oligo-NSAが実際に擬似的1,3アリル歪みによって制限された立体構造を剛直に形成しているのか、ペプチド主鎖骨格の剛直性がタンパク質認識に有利に寄与するのかが明らかになっていなかった。これは、oligo-NSAの合成が困難であり、窒素上に多様な置換基を有するoligo-NSAの簡便な合成法が確立されていなかったためだと考えられる。

以上から、ペプチドを用いた細胞内PPI阻害剤の開発に向け、本研究ではoligo-NSAの効率的な合成手法を確立し、oligo-NSAが擬似的1,3アリル歪みによって制限された立体構造を剛直に形成していること、及び、タンパク質認識におけるペプチド主鎖骨格の剛直性の重要性の実証を目指した。第2章では、多様な置換基を有するoligo-NSAの効率的な合成法の確立と立体構造解析を行い、oligo-NSAの立体構造の解明を試みた。第3章では、oligo-NSGとの比較を通して、oligo-NSAの主鎖構造が剛直に保たれていることの証明を試みた。また、ペプチド主鎖骨格の剛直性がタンパク質認識に重要であることを示すため、oligo-NSAを用いてタンパク質リガンドを設計し、その評価を行った。第4章では、oligo-NSAの主鎖骨格が、窒素上置換基に依らずモノマー単位で制御された立体構造を剛直に形成する、という第2章と第3章から得られた知見を応用し、oligo-NSAを用いて細胞内PPI阻害剤を効率よく設計する手法の提案と実証を行った。

第2章. 主鎖アラニン型ペプチドの固相合成法の確立と安定立体配座の解明

Oligo-NSGの α 炭素上にメチル基を導入しoligo-NSAとすることで、擬似的1,3アリル歪みによってペプチド主鎖骨格の立体配座を制限できると期待される。本章では、まずoligo-NSAを簡便に合成する手法の確立に取り組んだ。次に、合成したoligo-NSAの立体構造解析を行い安定配座の解明を試みることで、oligo-NSA

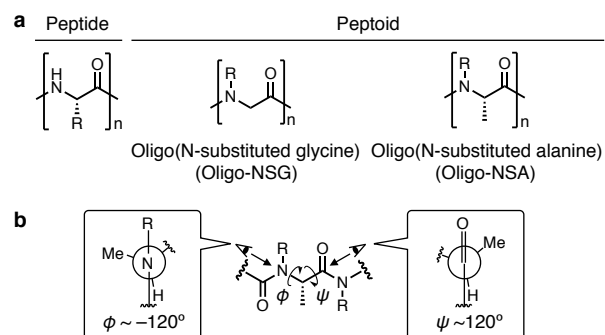


Figure 1. Chemical structure and proposed mechanism of conformational restriction of oligo(N-substituted alanine). (a) Chemical structures of peptide (left), oligo(N-substituted glycine) (oligo-NSG, middle) and oligo(N-substituted alanine) (oligo-NSA, right). (b) The mechanism of restricted rotations about ϕ and ψ angles of oligo-NSA by pseudo-1,3-allylic strains. Copyright 2019 American Chemical Society.

が実際に擬似的 1,3 アリル歪みに基づく立体構造を形成しているのかを調べた。

【Oligo-NSA の固相合成法の確立】多様な窒素上置換基を持つ oligo-NSA を合成すべく、Fmoc-アミノ酸とアルデヒドを用いて固相担体上でペプチドを合成するサブモノマー法を利用することにした⁷。本手法ではモノマーとして Fmoc-*N*-substituted alanine を事前に合成する必要が無く、市販のアルデヒドを用いた還元的アミノ化反応により、窒素上置換基の逐次導入が可能である。しかし、嵩高い *N*-substituted alanine 末端への Fmoc-alanine の縮合反応が進行しづらいこと、固相上からの切り出しに用いる酸性条件に対してオリゴマーが不安定であることにより、本手法を用いた NSA 構造が連続したオリゴマーの合成は実現していなかった。

そこでまず、*N*-substituted alanine 末端に対する Fmoc-alanine の縮合反応に用いる縮合剤の検討を行った。ペプチド固相合成に広く用いられているウロニウム系縮合剤として HATU、COMU、非対称酸無水物としてアミノ酸を活性化する EEDQ、*N*-メチルアミノ酸など立体障害の大きな縮合反応に用いられる BTC を縮合剤に用いて、*N*-isobutylalanine 末端に対する Fmoc-alanine の縮合反応を行い、その反応効率を比較した (Figure 2a)。その結果、比較的立体障害の小さい非対称酸無水物としてアミノ酸を活性化する EEDQ を用いた場合に最も高い反応効率を得られた。溶媒や反応時間を検討した結果、dioxane 中において 60°C で 3 時間の反応を 2 回繰り返すことで、定量的に反応が進行することが分かった。次に、最適化した縮合条件を用いて、Figure 2b に示す手順で oligo-NSA の合成を試みた。固相上からの切り出し反応時に oligo-NSA が酸によって分解されるのを避けるため、trityl リンカーが導入された固相担体を用いて合成を行い、hexafluoroisopropanol (HFIP) による切り出しを行った。また、2 残基目の Fmoc 基の脱保護時に diketopiperazine 形成によって固相担体から切り出されるのを防ぐため、C 末端に piperazine をスペーサーとして導入した。こうした最適化の結果、oligo-NSA を比較的高い収率で得ることができ、oligo-NSA のサブモノマー合成法の確立に成功した。

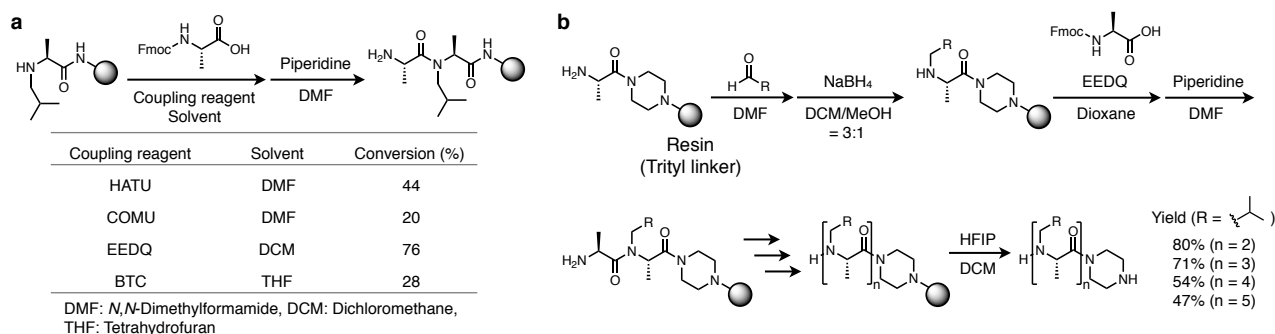


Figure 2. Optimization of coupling conditions and the established synthetic scheme of oligo-NSA. (a) Results of investigation of reagents for coupling of Fmoc-alanine to *N*-isobutylalanine terminus. After the coupling and deprotection, compounds were cleaved from resin and analyzed by HPLC. (b) Synthetic scheme of oligo-NSA and yields of 2–5 mer of *N*-isobutylalanine. Copyright 2019 American Chemical Society.

【Oligo-NSA の立体構造解析】Oligo-NSA が擬似的 1,3 アリル歪みに基づいた立体構造を形成しているのかを調べるため、合成したオリゴマーの立体構造解析を行った。まず、擬似的 1,3 アリル歪みによって、oligo-NSA の立体構造がどのように制限されるのかを予測するため、量子化学 (Quantum Mechanical: QM) 計算を行った。Oligo-NSA の最小単位として acetyl-*N*-methylalanine dimethylamide の 2 つの主鎖二面角 φ , ψ に関するラマチャンドラプロットを作成したところ、 $(\varphi, \psi) = (-120^\circ, 90^\circ)$ でエネルギーが最も安定になることが分かった (Figure 3a)。得られたモノマーの安定配座をもとに 5 残基 NSA を作成し、QM によるエネルギー安定化計算を行い、モデル構造を作成したところ、oligo-NSA は伸びた立体構造を形成することが示唆された (Figure 3b)。

上記の計算結果を実験的に確かめるため、*N*-benzylalanine のペンタマーの X 線結晶構造解析を行ったところ、Figure 3c に示す立体構造が得られた。QM 計算から得られたモデル構造と X 線結晶構造を比較すると、両者はおおよそ一致し、oligo-NSA が伸びた立体構造を形成することが実験的に示された。次に、水中において oligo-NSA が同様の立体構造を形成しているのかを調べるため、Figure 3d に示す oligo-NSA の NMR 構造解析を行った。¹H NMR スペクトルの帰属は、¹³C NMR、COSY、HMBC スペクトルを参照することで行った。

NOESY によって、主鎖骨格において空間的に近接した水素のペアを調べたところ、スペクトル上で **Figure 3d** に示すプロトン同士での相関が見られた。これらの水素同士の空間的な近接は、X 線結晶構造ともおおよそ一致しており、oligo-NSA が擬似的 1,3 アリル歪みによって立体構造が制限され、水中で伸びた立体構造を形成していることが示された。

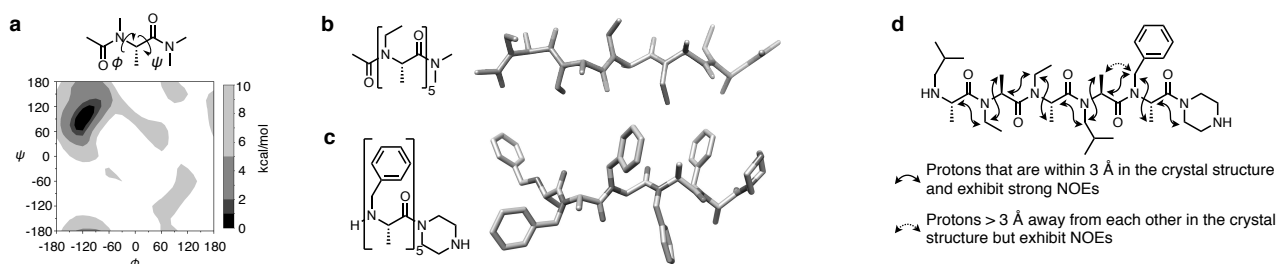


Figure 3. Structural analysis of oligo-NSA. (a) Energy diagram of acetyl-*N*-methylalanine dimethylamide as a minimal model of oligo-NSA generated by QM calculations at B3LYP/6-31G* level. (b) Chemical structure and model structure of acetyl-*N*-ethylalanine pentamer that was optimized at B3LYP/6-31G* level in water by QM calculations from an initial conformation of $(\chi, \varphi, \psi, \omega) = (-100^\circ, -120^\circ, 90^\circ, 180^\circ)$. (c) Chemical structure and crystal structure of *N*-benzylalanine heptamer. (d) Summary of spatial proximity information obtained from a NOESY measurement. Protons with strong NOEs that suggest rotational restrictions of backbone are indicated with solid arrows. Copyright 2019 American Chemical Society.

第 3 章. 主鎖アラニン型ペプチドの剛直性の評価と剛直性の分子認識への寄与についての検証

Oligo-NSG は主鎖骨格が柔軟であるために、タンパク質との相互作用がエントロピー的に不利となる。このため、一部の例外を除いて oligo-NSG のタンパク質親和性は低い。Oligo-NSA は擬似的 1,3 アリル歪みによって立体構造が制限されるため、oligo-NSG 型のペプチドに比べてタンパク質との高い結合親和性が期待される。しかし、タンパク質認識能の向上に向けて、ペプチド主鎖骨格を剛直にする戦略の妥当性は示されていない。本章では、第 2 章で明らかにした oligo-NSA の立体構造が剛直に保たれているのかを調べた。また、主鎖骨格を剛直にすることでタンパク質認識能を向上するという戦略の妥当性について検証した。

【Oligo-NSA の立体構造の剛直性評価】まず、oligo-NSA の伸びた立体構造がどの程度剛直に保たれているのかを、分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) 計算によって考察した。X 線結晶構造解析から得られた立体配座を初期配座とし、oligo-NSA、oligo-NSG の 500 ns 間の MD 計算を 5 回行った。MD 計算中の主鎖骨格の 5 つの α 炭素の初期配座に対する平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation: RMSD) の値をプロットしたところ (**Figure 4a**)、oligo-NSA は RMSD 値が比較的低い値に保たれているのに対して、oligo-NSG は RMSD 値が大きく変動していることが分かった。このことから、oligo-NSG の α 炭素上へのメチル基の導入によって、oligo-NSA の主鎖骨格が特定の立体配座に強く制限されることが示唆された。

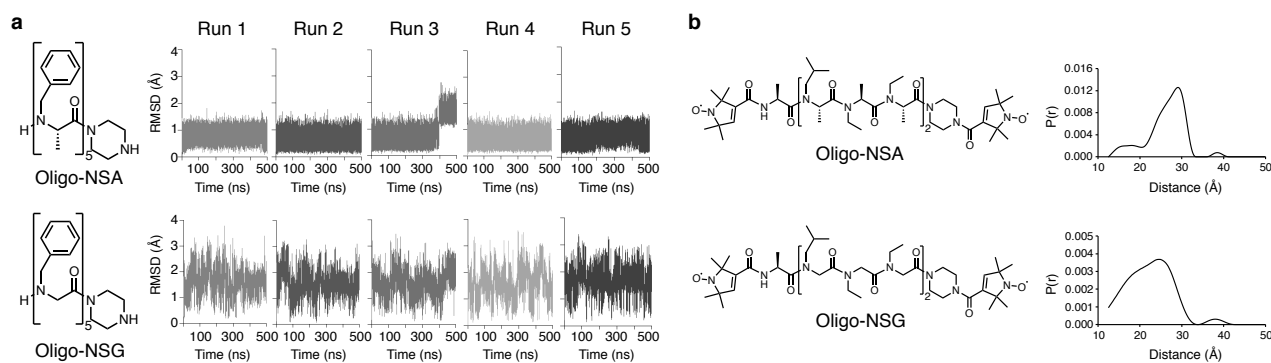


Figure 4. Evaluation and comparison of structural rigidity of oligo-NSA and oligo-NSG. (a) RMSD values of oligo-NSA and oligo-NSG during MD simulations. MD simulations were performed for 500 ns at 298 K using the CHARMM36m/CGenFF force field with five trials using the TIP3P water model. (b) Distribution of end-to-end distance of oligo-NSA and oligo-NSG calculated from EPR measurement. The oligomer in a 1:1 H₂O/DMSO mixture was rapidly frozen at 20 K and subjected to the measurement. Copyright 2019 American Chemical Society.

次に、oligo-NSA の剛直性を実験的に評価するため、oligo-NSA、oligo-NSG の末端間距離分布を電子常磁性共鳴法 (Electron Paramagnetic Resonance: EPR) により評価した。両末端を nitroxide radical によって標識したオリゴマーの EPR 測定を行った結果、oligo-NSA は、oligo-NSG に比べて狭い末端間距離分布が得られた (Figure 4b)。この結果は MD 計算の結果と一致しており、oligo-NSA の安定配座が oligo-NSG に比べて剛直に保たれていることが実験的に示唆された。

【ペプチド主鎖骨格の剛直性の分子認識への寄与についての検証】Oligo-NSA の主鎖骨格の剛直性がタンパク質との相互作用に有利に働くのかを調べるため、oligo-NSA を用いたタンパク質リガンドの設計、及び、その結合能評価を行った。本研究では、MDM2 と p53 の PPI をモデルとし、MDM2 リガンドの設計を行った。MDM2 と p53 の PPI には、p53 transactivation domain (p53-TAD) 中の 3 つのホットスポット Phe19、Trp23、Leu26 が大きく寄与している (Figure 5a)。MDM2 との共結晶構造⁸中の p53-TAD 上ホットスポットの α 炭素と β 炭素に対して、第 2 章で作成した oligo-NSA モデル構造中の 1、3、5 残基目側鎖の窒素と N_{α} 位炭素を重ね合わせると、RMSD = 0.88 Å で重なることが分かった (Figure 5b)。そこで、1、3、5 残基目の窒素上置換基に p53-TAD のホットスポットの側鎖を導入した oligo-NSA、同様の置換基を持つ oligo-NSG、NSA 構造と NSG 構造を交互に有する oligo-NSA/G を設計、合成した (Figure 5c)。

等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry: ITC) を行ったところ、oligo-NSA は $K_D = 1.1 \mu\text{M}$ で MDM2 に結合することが分かった (Figure 5d)。また、oligo-NSA と MDM2 との相互作用はエンタルピー駆動であり、特異的な相互作用であることが示唆された。次に、p53-TAD ペプチドの蛍光標識体を用いて、MDM2 に対する競合的結合能評価を蛍光偏光法 (Fluorescence Polarization: FP) により行った (Figure 5e)。Oligo-NSA が $K_i = 0.97 \mu\text{M}$ で結合能を示したのに対し、 α 炭素上メチル基が部分的に欠落した oligo-NSA/G は結合能が低下し、oligo-NSG は結合能を確認できなかった。この結果は、主鎖骨格の剛直性と相関している。以上から、oligo-NSA がタンパク質リガンドを設計する上で有用な分子骨格であること、ペプチドのタンパク質への親和性を向上する上で、主鎖骨格を剛直にすることの重要性が示唆された。

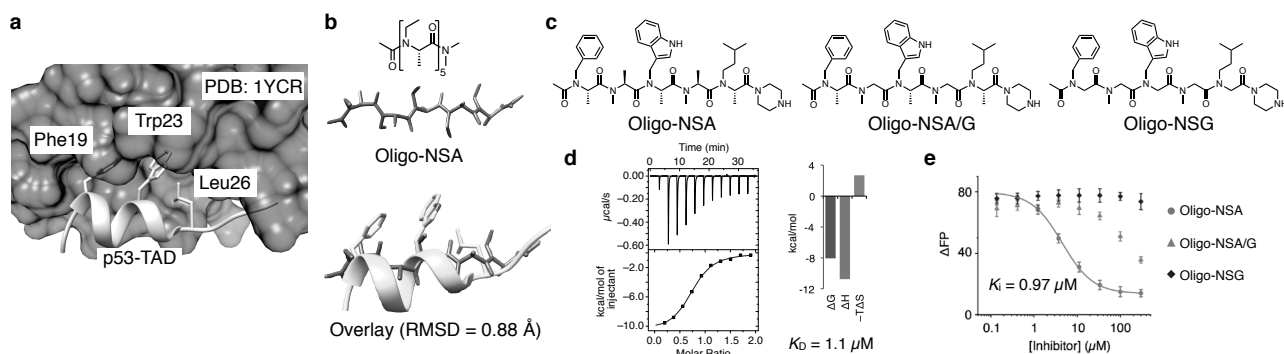


Figure 5. Design and binding assay of MDM2-binding oligo-NSA. (a) Crystal structure of p53-TAD binding to MDM2 from PDB 1YCR. (b) The model structure of penta-*N*-ethylalanine and overlay of the model structure of oligo-NSA and p53-TAD. RMSD value for C_{α} and C_{β} of hot-spot residues in p53-TAD and N and N_{α} of the first, third, and fifth residues of oligo-NSA is described. (c) Chemical structures of oligo-NSA, oligo-NSA/G, and oligo-NSG that bear functional N-substituents corresponding to the hot-spot residues of p53-TAD. (d) ITC profile of the interaction between the oligo-NSA and MDM2. (e) Inhibitory curves of oligo-NSA, oligo-NSA/G, and oligo-NSG against the interaction between fluorescently labeled p53-TAD peptide and MDM2 generated from competitive FP assay. Error bars represent standard deviations of triplicates. Copyright 2019 American Chemical Society.

第 4 章. 主鎖アラニン型ペプチドを用いた細胞内タンパク質間相互作用阻害剤の開発

第 3 章では、oligo-NSA を用いて MDM2 リガンドの設計に成功した。一方で、その結合親和性は μM オーダーにとどまっている。また、oligo-NSA が細胞内活性を持つ場合、MDM2 と p53 の相互作用の阻害により細胞内の p53 レベルが増大することが期待されるが、western blotting による評価の結果、設計した oligo-NSA は細胞内で活性を示さなかった。そこで本章では、oligo-NSA を用いて細胞内 PPI 阻害剤を効率よく設計する手法の提案を行い、oligo-NSA の細胞内活性の向上を試みることで、提案した手法の妥当性の実証を行った。

【阻害能、細胞膜透過性の向上のための設計戦略】Oligo-NSA は主鎖上の立体反発によって剛直な立体構造を実現しており、その構造は窒素上置換基に依存しない。よって oligo-NSA は、各モノマーを置換基の異なる別のモノマーに置き換えることで、主鎖構造を保ったまま、活性向上のための各置換基の最適化が可能だと期待される。本研究の場合、このような oligo-NSA の高いモジュラリティを活かすことで、結合親和性の改善に向けて、認識面に提示されている 1, 3, 5 残基目の各置換基を独立して最適化することが可能となる。また、認識面とは反対側に提示されていると予想される 2, 4 残基目の置換基を適切な脂溶性の置換基に改変することで、MDM2 との相互作用に影響を与えることなく細胞膜透過性を向上できると考えられる。そこで、本戦略に基づいて oligo-NSA の置換基の最適化を行い、細胞内 PPI 阻害剤の開発を試みることにした。また、第 3 章で設計した oligo-NSA の C 末端のカチオン性二級アミンは細胞膜透過に不利であると考えられるため、本章では C 末端の piperazine 構造を取り除いた oligo-NSA **4-1** を新たに設計し、各置換基の最適化を行った。

まず、MDM2 との結合能向上のため、MDM2 側に提示されていると予測される 1, 3, 5 残基目の置換基の改変を行った。いくつかの誘導体を合成し、MDM2 の既知リガンドである PMI ペプチド⁹ の蛍光標識体と MDM2 との相互作用に対する阻害能を FP によって評価した。その結果、3 残基目を 6-chloroindolylmethyl 基に、5 残基目を neohexyl 基に改変した場合に K_i の改善が見られた。最終的に、これらの置換基を組み合わせた oligo-NSA **4-2** は、 $K_i = 0.24 \mu\text{M}$ で MDM2 と PMI ペプチドの相互作用を阻害した (Figure 6a)。次に、細胞膜透過性の向上に向け、MDM2 とは反対側に提示されていると予測される 2, 4 残基目の置換基の改変を行った。脂溶性の異なる置換基を導入し、その細胞膜透過性を Caco-2 アッセイにより評価したところ、ethyl 基を導入した **4-3** は細胞膜透過性の指標となる P_e の値が向上した (Figure 6b)。一方で、より脂溶性の高い n-propyl 基、n-butyl 基を導入した場合には、水溶性が低下して評価ができず、親水性の高い hydroxyethyl 基を導入した **4-4** は P_e の値が低下した。Oligo-NSA **4-2**、**4-3**、**4-4** の阻害能を FP により評価したところ、阻害能は低下しておらず、MDM2 との相互作用を妨げることなく細胞膜透過性を調節できることが分かった。

置換基の改変前後で主鎖の立体構造が保たれているのかを NMR 構造解析により調べた。解析に必要な量を用意するため、比較的収率良くオリゴマーを合成可能な C 末端に piperazine 構造を持つ **4-1-Pip**、**4-3-Pip** について解析を行った。ROESY スペクトル上で、擬似的 1,3 アリル歪みによる主鎖二面角の制限を示唆する相関ピークが観測され (Figure 6c)、その相関ピークのパターンは、**4-1-Pip** と **4-3-Pip** の間で一致した。このことから、置換基の改変前後で主鎖の伸びた立体構造が保持されていることが示唆された。続いて、**4-1** と **4-3**

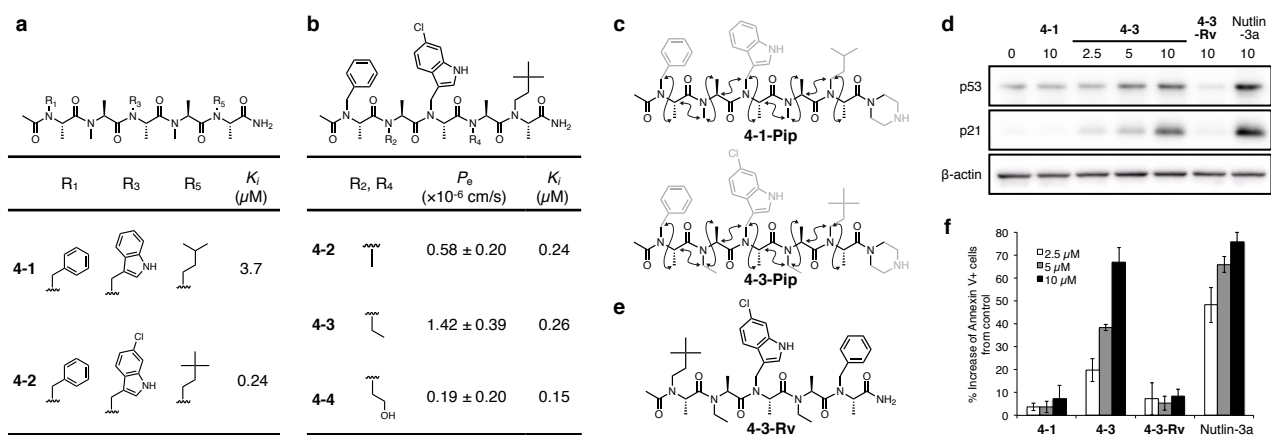


Figure 6. A modular approach toward improvement of binding ability and membrane permeability. (a) K_i values of compound **4-1** and **4-2**. The K_i values were determined from competitive FP assay against fluorescently labeled PMI peptide and MDM2. (b) P_e values and K_i values of compound **4-2**, **4-3** and **4-4**. The P_e values were determined from Caco-2 assay. The K_i values were determined from competitive FP assay. (c) Summary of spatial proximity information about backbone protons obtained from ROESY measurements. (d) Intracellular protein levels of p53, p21, and β -actin in SJS-1 cells. SJS-1 cells were incubated with 2.5, 5, or 10 μM oligo-NSAs or Nutlin-3a for 8 h and cell lysates were analyzed by western blotting. (e) Chemical structure of **4-3-Rv**. (f) Apoptotic response to oligo-NSAs or Nutlin-3a in SJS-1 cells. SJS-1 cells were incubated with 2.5, 5, or 10 μM oligo-NSAs or Nutlin-3a for 48 h, and the ratio of apoptotic cells was determined by Annexin V assay. Error bars represent standard deviations of three independent experiments.

の MDM2 結合時の立体構造を評価するため、oligo-NSA と MDM2 の複合体の MD 計算を行った。シミュレーション中、oligo-NSA の伸びた立体構造が保たれており、1、3、5 残基目の置換基が MDM2 と相互作用し、2、4 残基目の置換基が溶媒側に露出している様子が確認された。この結果から、oligo-NSA の結合能と細胞膜透過性向上に向けて、各置換基を独立に最適化するという上記戦略の妥当性が示唆された。

【Oligo-NSA の細胞内活性評価】MDM2 結合能、細胞膜透過性が向上した oligo-NSA **4-3** が細胞内で MDM2 と p53 の PPI を阻害し、アポトーシスを誘導できるのかを調べた。まず、MDM2 を過剰発現している SJSA-1 細胞を oligo-NSA **4-3** で 8 時間処理し、western blotting により p53、p21 の存在量を評価した (Figure 6d)。MDM2 と p53 の PPI が阻害されると、p53 の分解が低下し p53 と p21 の存在量が増加する。置換基改変前の oligo-NSA **4-1**、ホットスポットとなる置換基を C 末端側から導入した逆配列 **4-3-Rv** (Figure 6e) には活性が見られなかったが、置換基改変後の **4-3** で処理した場合には、濃度依存的に p53 と p21 の存在量が増加する様子が確認された。次に、Annexin V アッセイにより oligo-NSA のアポトーシス誘導能を評価した (Figure 6f)。SJSA-1 細胞を oligo-NSA で 48 時間処理した後、FITC 標識した Annexin V と混合し、フローサイトメトリーによる分析を行ったところ、**4-3** の濃度依存的なアポトーシス誘導能が確認された。一方で、逆配列 **4-3-Rv** は、アポトーシス誘導能を示さなかった。よって、**4-3** は MDM2 と p53 の PPI 阻害を介してアポトーシスを誘導していることが示唆された。以上から、oligo-NSA の高いモジュラリティを活かして各置換基を独立して最適化することで、MDM2 結合能、細胞膜透過性を向上し、細胞内 PPI を阻害するペプチドの開発に成功した。

第 5 章. 結言

本研究では、主鎖骨格が柔軟なためにタンパク質親和性が低いという oligo-NSG 型ペプチドの課題を克服すべく、oligo-NSA 型のペプチドに着目した。Oligo-NSA の簡便な固相合成法を確立し、立体構造解析、及び、タンパク質リガンド設計を行うことで、(1) oligo-NSA が擬似的 1,3 アリル歪みによってモノマー単位で制限された立体構造を剛直に形成すること、(2) 主鎖の剛直性がタンパク質認識能に有利に寄与することを初めて実証した。さらに本研究では、oligo-NSA の立体構造が置換基に依らずモノマー単位で制御されているという性質から、各モノマーを適切なモノマーに置き換えることで、主鎖の立体構造を保ったまま置換基を独立して最適化し、結合親和性と細胞膜透過性を向上するというモジュラー戦略を着想した。本戦略を利用することで、細胞内 PPI を阻害するペプチドの効率的な開発に成功した。今後、oligo-NSA と同様にモノマー単位で立体構造が制御される新たなビルディングブロックの開発や、本研究で提案したモジュラー戦略の適用によって、多様な細胞内 PPI を標的として阻害剤の開発が可能になることが期待される。

参考文献

(1) Simon, R. J. *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9367–9371. (2) Miller, S. M. *et. al.*, *Drug. Dev. Res.* **1995**, *35*, 20–32. (3) Tan, N. C. *et. al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5853–5861. (4) Zuckermann, R. N. *et. al.*, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678–2685. (5) Schneider, J. A. *et. al.*, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–10. (6) Gao, Y and Kodadek, T. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 360–369. (7) Pels, K. and Kodadek, T. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17*, 152–155. (8) Kussie, P. H. *et. al.*, *Science* **1996**, *274*, 948–953. (9) Pazgier, M. *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4665–4670.

発表論文

Publication related to the doctoral dissertation

(1) Morimoto, J[†]; Fukuda, Y.[†]; Kuroda, D.; Watanabe, T.; Yoshida, F.; Asada, M.; Nakamura, T.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Sando, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 14612–14623. [†]These authors contributed equally.

(2) Fukuda, Y.; Yokomine, M.; Kuroda, D.; Tsumoto, K.; Morimoto, J.; Sando, S. *Manuscript in preparation*.

Publication not related to the doctoral dissertation

(3) Morimoto, J; Fukuda, Y.; Sando, S. *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 5912–5915.