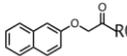


氏名 (本籍)	あさり とも 淺利 知 (神奈川県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論博第 376 号
学位授与の日付	令和 4 年 7 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	新規 myostatin 阻害ペプチドの創製とその分子機能解析における基礎的研究
論文審査委員	(主査) 教授 林 良雄 教授 野水 基義 教授 根岸 洋一 教授 三島 正規

## 論文内容の要旨

Myostatin (GDF-8, growth differentiation factor-8) は主に骨格筋に発現する TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) スーパーファミリーに属するサイトカインであり、筋成長に対する負の制御因子として機能していることから筋萎縮性疾患の治療標的として注目されている。これまでに所属研究室では、myostatin の prodomain (PD) に着目し、比較的小さな合成阻害ペプチドの開発に着手してきた。Myostatin の prodomain (PD) は生来の myostatin 阻害剤であり、Jiang らにより報告されたヒト PD の N 末端領域に由来する 74 アミノ酸残基を有するグルタチオン S トランスフェラーゼ融合タンパク (position of PD : 19-92) や大澤らにより報告されたマウス PD 由来の 29 残基の配列 (position of PD : 19-47) は myostatin 阻害活性を有していた。所属研究室では、このマウス PD 由来の 29 残基の配列に着目し、一連のペプチドを合成することで、阻害活性を有する最小構造であるペプチド **1** (position of PD : 21-43, 23 残基) の獲得に成功した。さらに、ペプチド **1** の N 末端に存在する Trp を欠損させた配列において、阻害活性が著しく低下することに着目し、Trp 側鎖の芳香環を基に一連のアシル化ペプチド誘導体を合成することで、より強力な阻害能 ( $IC_{50}=1.19 \mu M$ ) を有する 2-naphthoxyacetyl 化ペプチド **2** を獲得している (Figure 1)。

そこで筆者は、本博士論文研究において、ペプチド **1** の分子機能を明らかにするために構造活性相関 (SAR) 研究を展開した。まず

	Prodomain	Sequence	Pro-myostatin
Jiang et al.	Human <b>19-92</b>	CTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAP...	42-115 GST-Fusion
Ohsawa et al.	Mouse <b>19-47</b>	CAWRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRLETAP-amide	43-71
peptide <b>1</b>	Mouse <b>21-43</b>	WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLR-amide	
peptide <b>2</b>	Mouse <b>22-43</b>	 RQNTRYSRIEAIKIQILSKLR-amide	

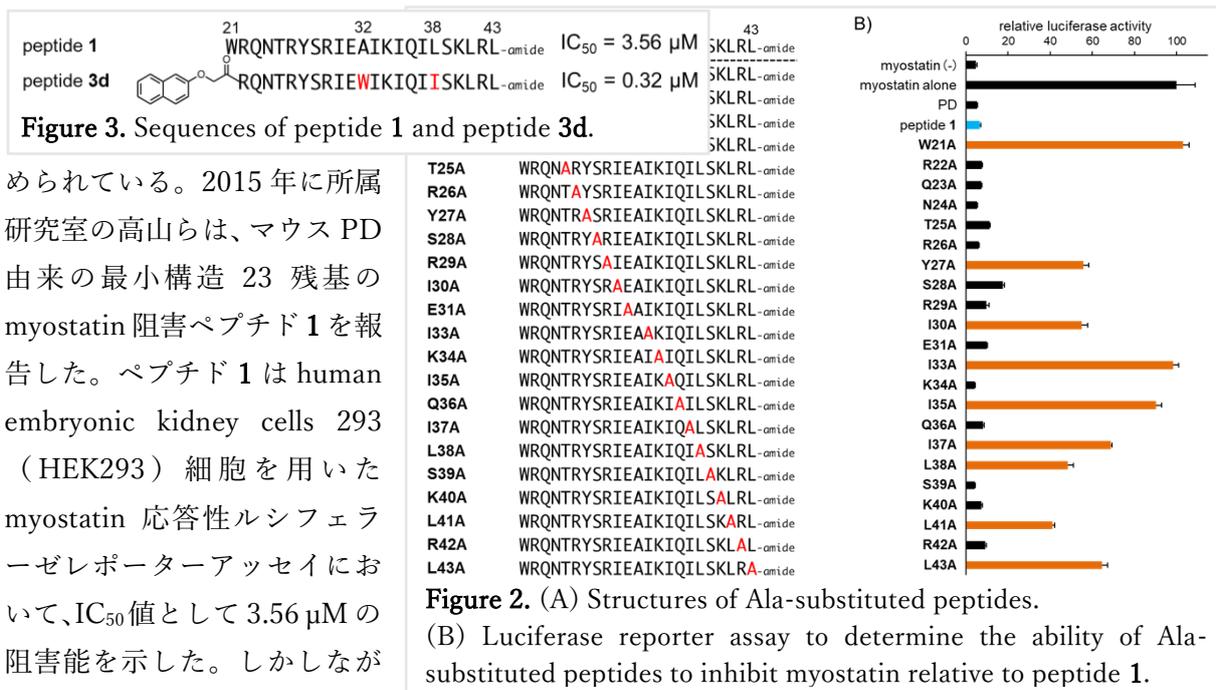
**Figure 1.** History of PD-derived inhibitory peptides.

第一章では、阻害活性に重要であるアミノ酸残基の探索を目的としたアラニンスキャンを行うために Ala 置換ペプチドの合成およびそれらの myostatin 阻害活性評価を実施した。この結果を基

に、ヒトとマウスの PD 間で配列が異なりかつ、阻害活性発現に重要であった 27 位 Tyr の置換ペプチドの合成と、アラニンスキャンにより未評価であった 32 位 Ala の置換ペプチドの合成を行い、阻害活性評価を実施した。加えて、ペプチド C 末端側に存在する阻害活性発現に重要な分岐鎖アミノ酸残基 (Leu および Ile) の置換ペプチドを合成し、阻害活性の評価を実施した。得られた知見を基に、高阻害活性ペプチド **3d** (22 残基) の創製に成功した。第二章では第一章で得られた知見をもとに各種短鎖化阻害ペプチドの創製と非天然アミノ酸および D アミノ酸への置換の検討を行い、高活性短鎖化ペプチド **10a** (16 残基) の獲得に成功した。さらに、高活性化に伴い二次構造に大幅な変化が生じ、 $\beta$ -sheet 構造の割合が増加することを見出した。第三章ではペプチド **1** の二次構造解析結果をもとに、ペプチドの二次構造モデルの計算を実施した。得られた二次構造モデルを成熟 myostatin の結晶構造へドッキングシミュレーションすることにより、安定な結合を示す阻害様式を見出した。

## 第一章 Myostatin 阻害ペプチドの配列評価および構造活性相関

Myostatin は魅力的な創薬標的であり、さまざまな病態の治療を目的とした阻害剤の開発が進



められている。2015年に所属研究室の高山らは、マウス PD 由来の最小構造 23 残基の myostatin 阻害ペプチド **1** を報告した。ペプチド **1** は human embryonic kidney cells 293 (HEK293) 細胞を用いた myostatin 応答性ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、IC<sub>50</sub> 値として 3.56 μM の阻害能を示した。しかしながら、マウス myostatin PD 由来

の配列であるペプチド **1** が成熟 myostatin を効率的に阻害する構造的な根拠は明らかとなっていなかった。そこで、第一章ではペプチド **1** を基に阻害活性に重要な残基の同定と、更なる高活性阻害剤創製に向けた SAR に着手した。ペプチド **1** のアラニンスキャンにより、阻害活性発現に重要な残基として Trp21、Tyr27 と C 末端に存在する分岐鎖アミノ酸 Ile30、Ile33、Ile35、Ile37、Leu38、Leu41、Leu43 の同定に成功した (Figure 2)。また、ペプチド **1** の阻害活性における二次構造の重要性を明らかにするため、Pro 置換ペプチドを合成し、二次構造解析を行った。その結果、32-36 位付近に形成される  $\alpha$ -helix 構造が myostatin の阻害に特に重要な役割を果たしてい

ることを明らかにした。得られた知見を基に更なる高活性阻害剤の獲得を目指し、重要アミノ酸における SAR を実施した。Tyr27、Ala32 に着目した SAR より、**A32W** において阻害活性の増加が見られた。加えて、C 末端に存在する分岐鎖アミノ酸の検討より **L38I** において阻害活性の増加が見られた。これら 2 つの置換および 21 位 Trp の 2-naphthyloxyacetyl 置換を有するペプチド **3d** を合成し、阻害活性の評価を実施したところ、ペプチド **1** より約 11 倍強力な阻害活性 ( $IC_{50} = 0.32 \mu M$ ) を有するペプチドの獲得に至った (**Figure 3**)。ペプチド **3d** は DMD モデル (mdx) マウスのみならず、野生型 ICR マウスにおいても筋増強を促した。

## 第二章 Myostatin 阻害ペプチドの短鎖高活性化

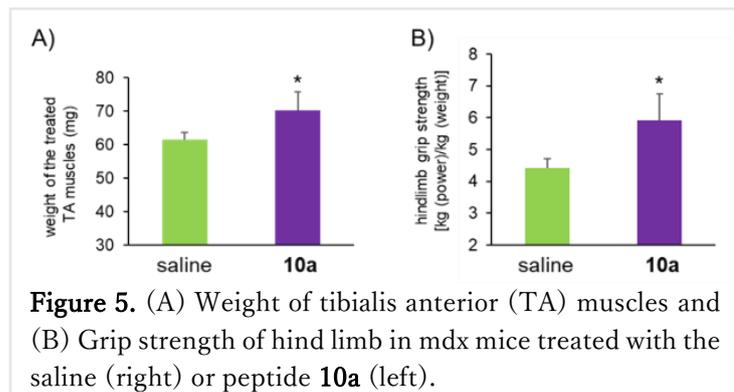
ペプチド医薬品の開発において、配列を短くすること (短鎖化) は、抗原性の低下、生体内での薬物動態の向上、製造コストの削減などの効果が期待できるため、極めて重要な課題である。そこで、筆者は 16 残基ペプチド **4** を基にペプチドの短鎖化と高活性化を目的とした SAR に着手した。天然アミノ酸のみで構成された 16 残基ペプチド **8b** (H-WYIRWIKIQIWSKLRL-amide) は、筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスおよび野生型の C57BL/6 マウスで筋肥大

	21	28	32	38	43	
peptide <b>1</b>	WRQN	TRYS	SRIE	AIKIQ	ILSKLRL	-amide $IC_{50} = 3.56 \mu M$
peptide <b>4</b>			SRIE	AIKIQ	ILSKLRL	-amide $IC_{50} > 30 \mu M$
peptide <b>10a</b>			WYIR	wIKX	QIWSKXRL	-amide $IC_{50} = 0.13 \mu M$

**Figure 4.** Sequences of peptide **1**, **4**, and **10a**.  
(X = cyclohexylglycine)

を誘導することが示された。続く、非天然アミノ酸と D 体アミノ酸の検討により得られた最も強力な阻害ペプチドであるペプチド **10a** は、非天然アミノ酸である cyclohexylglycine と D 体アミノ酸である

D-Trp を含むが、第一章で獲得したペプチド **3d** よりも 2 倍強力な myostatin 阻害活性を示した ( $IC_{50} = 0.13 \mu M$ ) (**Figure 4**)。また、mdx マウスを用いた検討では、ペプチド **10a** の投与により前脛骨筋 (TA) の重量および後肢の握力が有意に改善され、20 残基以下で構成される myostatin 阻害ペプチドが、病態モデルマウスの骨格筋機能を改善させることを示した (**Figure 5**)。

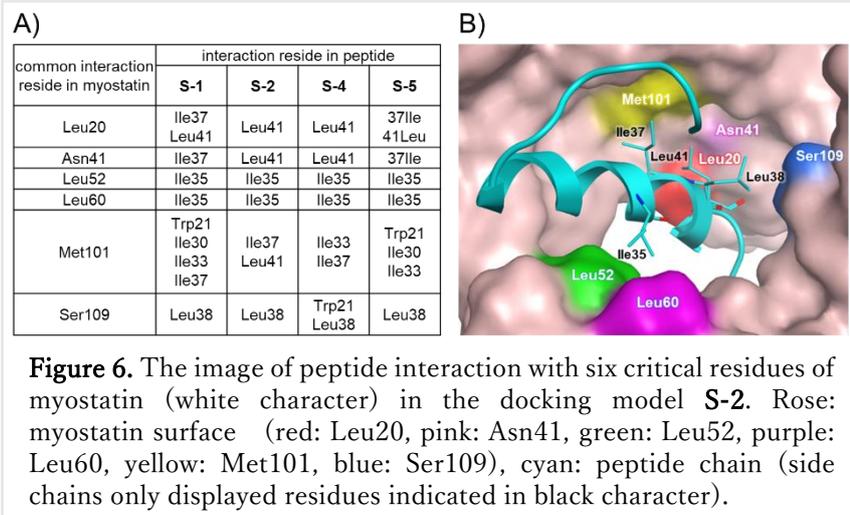


### 第三章 阻害ペプチドのドッキングシミュレーション

第二章までの検討により強力な myostatin 阻害剤の獲得に成功したが、一連のペプチド阻害剤の myostatin に対する詳細な結合様式については、十分に検討されていない。第三章では更なる高活性ペプチド創出の足がかりとして、各種分析や研究で得られた情報を活用し、最も基本的な構造であるペプチド

ド 1 に着目して Molecular Operating Environment (MOE) ソフトウェアを用いたドッキングシミュレーションを行った。成熟 myostatin の配列は種間で相同性が高く、マウス、ラット、ヒト、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウでは完全に一致している。PD においても配列は高度に保存されており、ヒトとマウスでは 95% の相同性が示されている。このことから、筆者は Cotton らが 2018 年に報告したヒト pro-myostatin の公開結晶構造 (PDB, コード: 5NTU) をもとに、homology modeling によるマウス pro-myostatin の構築を試みた。得られた pro-myostatin の構造から成熟 myostatin の構造と阻害ペプチドの基本構造を切り出し、各計算を実施した。すなわち、ペプチド 1 の 30-41 位の領域の主鎖のみを拘束し、Conformational Search で獲得した安定構造と成熟 myostatin の結晶構造を用いて Protein-Protein docking を実施した。得られた構造から、activin type I receptor binding site に結合し、アラニンスキャンで明らかとなった阻害活性に重要な 9 つの残基全てが相互作用を示した結合様式を見出した。また、得られた複数のモデルの相互作用解析により、阻害活性に重要な 9 つの残基が共通して相互作用している activin type I 受容体結合部位のアミノ酸残基を提案するに至った (Figure 6)。これらの知見は、将来の構造活性相関研究に対して極めて重要であり、 $\alpha$ -helix 構造による空間占拠を模した高活性・短鎖化ペプチドを代表とした  $\beta$ -sheet 構造ペプチド、小分子化合物などの開発に新たな着想を提供すると考えられる。

本研究では、高活性 myostatin 阻害剤の開発及び、短鎖化ペプチドの開発を行った。今回筆者が報告した短鎖化ペプチドは筋萎縮性疾患をはじめとする myostatin 関連疾患に適用できる可能性を秘めた阻害剤の候補である。また、未知の結合様式について、シミュレーションを用いて相互作用様式を解析することで、より高活性な化合物獲得へのステップを減らし、速やかな阻害剤開発へ繋がるのが期待される。この様な観点からも、*in vitro* 及び *in vivo* において良好な阻害活性を示す各種ペプチドを獲得し、次世代高活性阻害剤創製への基盤的知見を明らかにした本研究成果は、大変意義深いものである。



**Figure 6.** The image of peptide interaction with six critical residues of myostatin (white character) in the docking model S-2. Rose: myostatin surface (red: Leu20, pink: Asn41, green: Leu52, purple: Leu60, yellow: Met101, blue: Ser109), cyan: peptide chain (side chains only displayed residues indicated in black character).

【研究結果の掲載誌】

- 1) **T. Asari**, K. Takayama, Y. Hayashi, *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 8, 1, 113-117 (2017).
- 2) K. Takayama, C. Rentier, **T. Asari**, Y. Hayashi, *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 8, 7, 751-756 (2017).
- 3) K. Takayama, **T. Asari**, Y. Negishi, Y. Hayashi, *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 10, 6, 985-990 (2019).
- 4) **T. Asari**, Y. Hayashi, K Takayama, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 40, 116181. (2021).

## 【論文審査の結果の要旨】

浅利知氏の博士学位申請論文は、「医化学」の分野に申請されたものである。氏は、myostatin 阻害活性を有するペプチドの配列評価と構造活性相関による高活性ペプチドや高活性短鎖化ペプチドの獲得およびドッキングシミュレーションによる結合様式探索の研究を行い、4報の学術論文として報告している。本学位申請論文は、これらの研究成果を三章に亘ってまとめたものである。

筋増殖を負に調節するタンパク性因子 myostatin を阻害することで、新規筋萎縮性疾患治療薬を開発する試みが世界で実施されている。所属教室では myostatin prodomain (PD) タンパク質が生来有する myostatin 阻害活性に着目し、マウス PD から阻害活性を有する最小構造単位として 23 残基のペプチド配列を報告している。そこで、当該ペプチドの基礎的研究として、浅利氏はその分子機能解明と構造活性相関研究に基づいた高活性 myostatin 阻害剤の創製を目指した。

第一章では、マウス PD 由来の最小構造 (21-43 位) からなる 23 残基のペプチド 1 (H-WRQNTRYSRIEAIKIQLSKLRL-amide) を基に阻害活性に重要な残基の同定と、更なる高活性阻害剤創製に向けた構造活性相関研究 (SAR) に着手した。ペプチド 1 のアラニンスキャンにより、阻害活性発現に重要な残基として Trp21、Tyr27 と C 端側に存在する分岐鎖アミノ酸 Ile30、Ile33、Ile35、Ile37、Leu38、Leu41、Leu43 (計 9 残基) の同定に成功した。また、ペプチド 1 の阻害活性における二次構造の重要性を明らかにするため、Pro 置換ペプチドを合成し、それらの二次構造解析を行った。その結果、32-36 位付近に形成される  $\alpha$ -helix 構造が myostatin 阻害に特に重要な役割を果たすことを明らかにした。得られた知見を基に更なる高活性阻害剤の獲得を目指し、重要アミノ酸残基に注目した SAR を実施、A32W や L38I ペプチドにおいて阻害活性の増強を確認した。これら 2 つの部位における置換、および 21 位 Trp の 2-naphthyloxyacetyl 基への置換を含むペプチド 3d (XRQNTRYSRIEWIKIQLSKLRL-amide, X = 2-naphthyloxyacetyl group) が、ペプチド 1 より約 11 倍強力な myostatin 阻害活性 ( $IC_{50}=0.32 \mu M$ ) を示すことを明らかにした。

第二章では、ペプチド性医薬品の開発に必要な抗原性低下や薬物動態向上、製造コスト削減等を勘案するために、短鎖化ペプチドの創製を実施した。すなわち、ペプチド 1 の部分構造からなる阻害活性の無い 16 残基ペプチドを基に SAR を展開した。その結果、天然アミノ酸のみで構成された 16 残基ペプチド 8b (H-WYIRWIKIQLSKLRL-amide) が筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) および野生型マウス (C57BL/6) において筋肥大を誘導することを見出した。さらに、非天然アミノ酸と D 体アミノ酸を導入した最も強い阻害活性を有するペプチド 10a (H-WYIRwIKXQIWSKXRL-amide, X = cyclohexylglycine) の獲得に成功した。当該ペプチド 10a は、第一章で獲得したペプチド 3d よりも 2 倍強力な myostatin 阻害活性を示した ( $IC_{50}=0.13 \mu M$ )。また、mdx マウスを用いた *in vivo* 評価において、ペプチド 10a を前脛骨筋へ投与することで、その重量増加を確認し、更に後肢握力の有意な上昇を見出し、20 残基以下の myostatin 阻害ペプチドが病態モデルマウスにおいて骨格筋機能を改善できることを示した。

第三章では、更なる高活性ペプチド創出への足がかりを得るために、上記研究で得られた情報を活用し、myostatin とペプチド 1 のドッキングシミュレーションを Molecular Operating Environment を用いて実施した。その結果、アラニンスキャンで明らかとなった阻害活性に重要な 9 つの残基の全てが、myostatin

上の activin type I 受容体結合部位に相互作用を示す結合様式を見出した。また、得られた複数のモデルの相互作用解析から、これらの 9 つの残基が共通して相互作用する activin type I 受容体結合部位のアミノ酸残基の提案に至った。

以上、浅利氏の本博士学位申請論文は、in vitro 及び in vivo において良好な阻害活性を示し、筋萎縮性疾患をはじめとするマイオスタチン関連疾患に適用できる可能性を秘めたマイオスタチン阻害ペプチドの創製、および計算科学手法によりそれらのマイオスタチン結合様式を提案した研究である。高活性マイオスタチン阻害剤創製への基盤となる科学的知見を提供しており、筋萎縮性疾患に対する創薬の発展に大きく貢献できる成果である。したがって、本論文は博士(薬学)学位申請論文として相応しい内容を有すると判断する。