

【報告様式A】

作成／更新日:令和4年5月8日
課題管理番号: 21am0101090j0005

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名： (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：(日本語) 菅 裕明
(英語) SUGA Hiroaki

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人東京大学・大学院理学系研究科化学専攻・教授
(英語) The University of Tokyo, Graduated School of Science, Professor

II 補助事業の概要

本事業計画の中では、菅らが開発した特殊ペプチド探索技術 RaPID システムを駆使し、被支援者が望む標的タンパク質に対して高親和性をもつ特殊ペプチドリガンドを探索、発見し、化学合成した特殊ペプチド化合物を被支援者に提供することを目的とした。特に、本計画では一般的な低分子化合物スクリーニングではヒット化合物が得られていない、あるいは得難い、いわゆる non-druggable な標的に対して薬物候補を発見し提供する支援を優先して行ってきた。その中には、蛋白質間相互作用の阻害剤（PPI 阻害剤）や受容体膜蛋白質の活性化（アゴニスト）といった、これまで開発が難しかった薬剤開発にも果敢に挑んだ。また、本事業内では、国内研究者だけでなく海外研究者との共同研究も積極的に進め、特殊ペプチド創薬の新たな展開も模索した。「高度化」においては、前事業で開発した RaPID システムを運用できる 2 腕ロボット、SENTAKun をユーザーフレンドリーにするため、ロボットの生産元にプログラムの再開発を委託し、その改良プログラムに適したプロトコールを新たに確立した。それにより、様々な条件下で標的タンパク質に対する RaPID 探索を可能にするセミ自動化システムへ進化させた。

1) 支援

本計画の支援においては、被支援者から要望される新規標的タンパク質に対し環状特殊ペプチドを探索した。全体的には、下記のようなマイルストーン①～⑤を置いて実施した。

- ① 標的タンパク質を固定化するためのタグデザインと条件検討
- ② 特殊ペプチドの RaPID セレクション
- ③ 活性特殊ペプチドの同定と合成
- ④ 活性特殊ペプチドの薬剤活性の評価と高機能化
- ⑤ 活性特殊ペプチドと標的タンパク質との共結晶化

2020 年度も、①～④の支援を中心に進めた。2022 年 3 月まで計 17 件の支援を行い、うち 13 件の支援に関しては完了した（完了のクライテリアは、特殊ペプチドを獲得、化学合成し、非支援者に送付、活性の強弱に関わらず目的の活性を確認）。4 件については、タンパク質の挙動が極めて悪い（例えば、ビーズ固定化時に凝集が起きてしまう）あるいは、探索を試みたが活性種の濃縮がかからなかったため（バックグラウンド吸着が何らかの理由で高すぎるため）、断念という形で支援を完了した。各支援の結果あるいは進行状況の詳細については、特許性、論文性の保護の観点から、公開書類である本報告書での公表を割愛する（具体的な支援案件については、非公開報告書を参照）。

(2) 高度化

RaPID システムの 2 腕ロボット (SENTAKun) によるセミ自動化、特に標的タンパク質の固定化挙動に対して、ユーザーが迅速に実施プロトコール（洗浄の回数やインキュベーションの時間）の変更を行うことが可能なプログラムへアップグレードしたシステムに改良した。全体的には下記のようなマイルストーン①～⑤を置いて実施してきた。

- ① ユーザーフレンドリー (UF) プログラム開発
- ② UF プログラムの検証
- ③ UF プログラムの修正と検証の繰り返し
- ④ 新規標的での検証
- ⑤ 支援への適応

一方、2019年度から進めたβアミノ酸含有ペプチドライブラリーの構築に成功し、Nature Chemistry (DOI: 10.1038/s41557-020-0525-1) への論文発表、並びに特許出願に至った。本年では、D/Lハイブリッドペプチドライブラリーの構築、セレクションに成功した。この成果は、JACS(DOI: 10.1021/jacs.1c02593)に報告した(本成果は前述特許に含まれる)。また前プログラム(創薬プラットフォーム事業)から進めていたPlexinB1ペプチドについても動物実験の成果をPNAS (DOI: 10.1073/pnas.2012266117)に発表するに至った。

その他、これまで進めていた海外研究者との共同研究も当該年度に成果が多く上がり、論文発表に至っている。特に、USCF大のKevan Shokat教授との共同研究においては変異KRAS分子を標的とした医薬品候補化合物の開発では画期的な成果が上がった。変異KRAS分子標的薬は最近その有効性が臨床で得られ、注目を浴びている研究分野である。こうした画期的な達成はG12C変異のシステイン残基に選択的に共有結合をする化合物の発見から始まった。しかしながら、G12C変異よりもG12Dという変異の方が患者には多くみられ、この変異KRASに選択的な化合物の追求が期待されているが、アスパラギン酸残基と共有結合を作る分子の創出は困難を極めている。そこでUCSFのKevan Shokat教授らと共同研究体制を組み、RaPIDシステムを駆使して、G12Dに選択的な環状ペプチドを開発した(Zhang et al, ACS Central Science 2021)。5ラウンドの高いセレクション圧の実験を経て発見された3種類の環状ペプチドは、G12D変異タンパクに選択的に結合し(図1)、GTP結合様式に特異的に結合することがわかり、非病理体である野生KRASには結合を示さないため副作用を大幅に低減した薬剤候補と期待できる。さらに、これらの環状ペプチドは、KRASタンパクのSwitch IIという領域に結合し、RASのエフェクターであるRAFとの相互作用を阻害することも示すことができた。

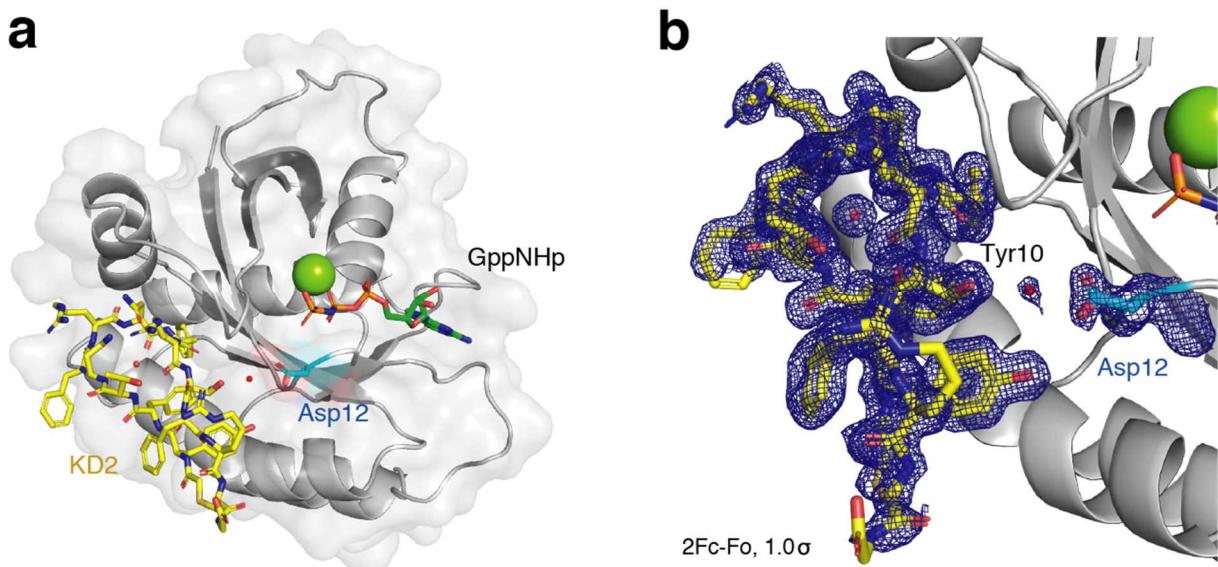


図1: KRAS-G12D変異体と特殊環状ペプチドKD2との共結晶構造。(a)非加水分解型GTP(GppNHp)とKRAS-G12D変異体にペプチドが結合するMg²⁺を囲む親指に相当するタンパク質ドメインが大きく変化し、Open型の構造になることでRAFとの結合を阻害する。(b)KD2は、KRAS-G12D残基に対して水分子を介して特異的に水素結合をすることで特異性を獲得している。(Zhang et al, ACS Central Science 2021より)

This research program aimed at discovering non-standard (or pseudo-natural) macrocyclic peptides against various protein targets, particularly those so-called “non-druggable”, and providing appropriate hits with high affinities in the range from low nM to sub-nM. The program had two major components: (1) Assisting Projects; the discovery of macrocyclic peptides against targets given by researchers who desire to tackle non-druggable targets of their interest, such as protein-protein interaction (PPI) inhibition; and (2) Development Projects; semi-automation for the RaPID screening by means of a two-armed human-like robot via a user-friendly program. In (1), Dr. Suga’s team conducted the RaPID screening of pseudo-natural macrocyclic peptides against protein targets which was asked by researchers. This system has a prestigious history of successes in discovering potent not only inhibitors against various extra- and intra-cellular targets, but also activators (agonists) acting like natural ligand peptides toward membrane receptors. Particularly, so-called non-druggable targets, i.e. those had been difficult to be targeted by small molecules, will be the priority choices of this program. He conducted 17 Assisting Projects regardless the disease areas from cancer to central nervous system. Among them, 13 projects were successfully conducted, yielding desired macrocyclic peptides that antagonize or agonize the target proteins. In (2), despite the fact that the RaPID system is extremely reliable and rapid to deliver hits against any targets, the screening (selection) processes require technical demands and labors. This project aimed at updating a two-armed human-like robot, SENTAKun, with a user-friendly program that enables us (or researchers) to run the RaPID system in a semi-automation manner. We developed a program to conduct the RaPID system, which was more user-friendly with a better interface.

In this program, we also set up not only Japanese researchers but also foreign researchers, *e.g.* USA, Israel, and Germany. One of the projects, the collaboration with Prof. Kevan Shokat afforded macrocyclic peptide inhibitors against KRAS-G12D mutant. Since this mutation on KRAS is the predominant in cancer patients, the discovery of specific inhibitors against this mutant has given great impact to the field of research. We revealed that the macrocycles specifically inhibit the GTP-bound form of the KRAS-G12D mutant over the wild type KRAS (GDP-bound form dominant), resulting in disruption of interaction with Raf1 protein responsible to transduce the downstream signalling. We also solved the X-ray structure of the ternary complex, KRAG-G12D/GppNHp with KD2, one of the potent inhibitors (**Figure 1**). Surprisingly, KD2 induces drastic structural change of the complex, where the GTP binding site is opened to expose the GTP to solvent and disrupt the interaction surface with Raf1 protein. This work was published in ACS Central Science (Zhang et al, 2021).

In conclusion, many researchers had accessed to *de novo* pseudo-natural peptides generated by the RaPID system against their proteins of interest and accelerated their research for basic/applied science and drug discovery. At the same time, such outcomes have stimulated the “game changes” of drug development with significant economic impacts.

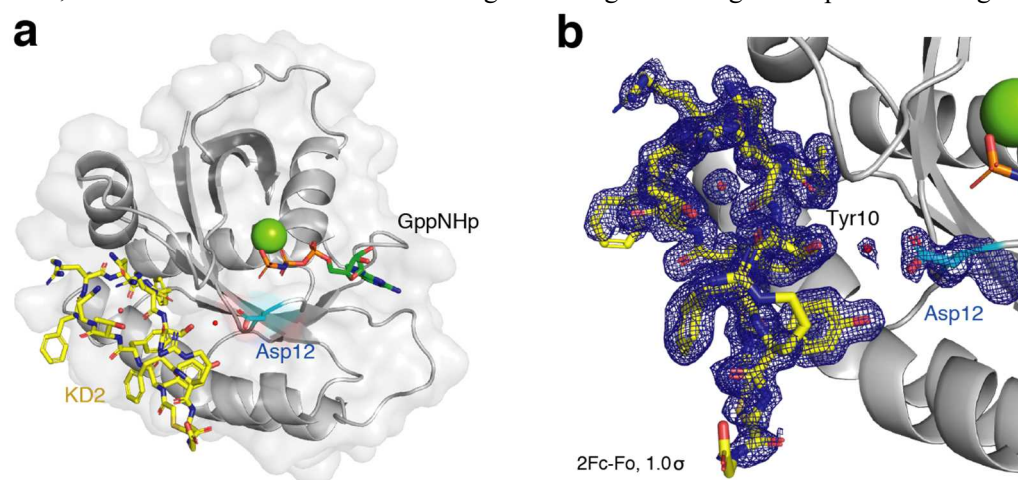


Figure 1: (a) The ternary complex of KRAG-G12D/GppNHp with KD2. GppNHp is a non-hydrolyzed GTP analog that binds to Mg²⁺. (b) The macrocycle inhibitor, KD2, interacts with the Asp12 residue on KRAS-G12D via a single water molecule, resulting in tight binding with IC₅₀ of 12 μM.