

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：アロステリックにタンパク質-タンパク質相互作用を阻害する induced-fit 型小分子の創出
Development of induced-fit-type small molecules that allosterically inhibit protein-protein interaction

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：鈴木 孝禎
Takayoshi Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人大阪大学 産業科学研究所 教授
National University Corporation The University of Osaka, SANKEN, Professor

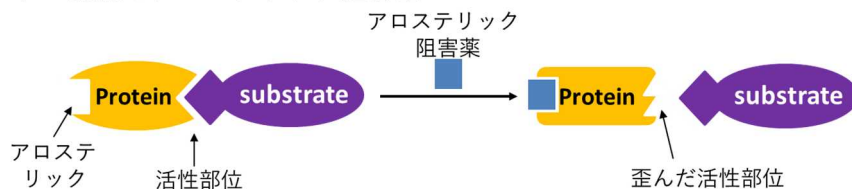
II 研究開発の概要

タンパク質-タンパク質相互作用（Protein-Protein Interaction: PPI）は、がんや神経精神疾患などの様々な疾病に関与することから、これまで、PPI 阻害薬の創製研究が盛んに行われてきた。しかし、一般に、PPI の広く浅い作用面に対して阻害面を十分にカバーするには、中分子以上の大きさが必要とされ、低分子 PPI 阻害薬の創製は、未だに困難な課題である。

本研究では、一般的なアロステリック阻害薬（図 1A）に倣い、アロステリックに PPI を阻害する induced-fit 型小分子（図 1B）の創出を目的とした。本研究で創出される「アロステリック型 PPI 阻害小分子」は、低分子化合物に PPI 阻害という新たな可能性を与えると同時に、これまでの PPI 阻害薬が抱える、低い膜透過性・組織移行性、高い製造・開発コストなどの問題を解決する。

具体的には、特に神経精神疾患に関与するタンパク質 X、Y とタンパク質の相互作用標的とし、神経細胞選択性を有し、血液脳関門（BBB）を透過する低分子 PPI 阻害薬の創製を試みた。

A) 一般的なアロステリック阻害薬



B) アロステリック型PPI阻害薬（本研究）

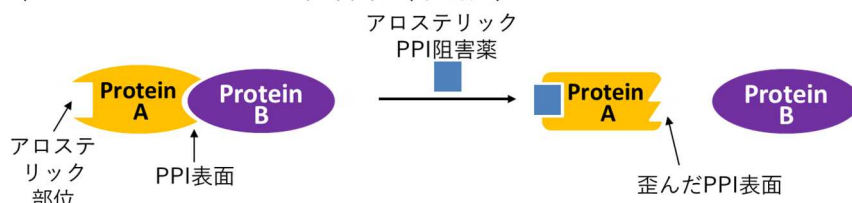


図 1.

A) 一般的なアロステリック阻害薬は、アロステリック部位に induced-fit することにより、タンパク質の構造変化を引き起こし、活性部位の構造を歪めて、タンパク質と基質の結合を阻害する。
B) 本研究で創製するアロステリック PPI 阻害薬は、アロステリック部位に induced-fit することにより、タンパク質の構造変化を引き起こし、PPI 表面の構造を歪めて、PPI を阻害する。

(1) Induced-fit 型 X-タンパク質相互作用阻害薬の創製

クリックケミストリーにより、既知のタンパク質 X 阻害薬の誘導体群を 20 化合物合成し、酵素阻害活性評価、速度論解析を行った。

解離遅延型阻害薬には、非 induced-fit 型と induced-fit 型に分類されるが、酵素反応速度論解析により識別することが出来る。様々な濃度の阻害薬存在下でタンパク質 X の脱アセチル化反応速度を測定し、見かけの反応速度定数 k_{obs} を求める。 k_{obs} を縦軸に、阻害薬濃度を横軸にプロットした際に、直線性を示す化合物が非 induced-fit 型阻害薬、非直線性を示す化合物が induced-fit 型阻害薬として同定できる。本速度論解析を行った結果、 $K_i = 7.2 \text{ nM}$ の非 induced-fit 型タンパク質 X 阻害薬 A、 $K_i = 0.24 \text{ nM}$ の induced-fit 型タンパク質 X 阻害薬 B、 $K_i = 0.34 \text{ nM}$ の induced-fit 型タンパク質 X 阻害薬 C を見出した。

つぎに、化合物処理した Neuro2a 細胞からタンパク質を抽出後、抗 X 抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行った。その後、IP 溶出物の酵素消化、Tandem Mass Tag (TMT) ラベル化反応を行い、すべてのサンプルを混合して LC-MS/MS によるタンパク質の同定と相対的定量解析を行った。データ解析では X の定量値がサンプル間で同じになるように補正し、コントロール (DMSO 処理) を基準 (100) にして各サンプルにおけるタンパク質の相対的定量値を算出した。その結果、阻害薬 B (非 induced-fit 阻害薬) に比べ阻害薬 C (induced-fit 阻害薬) 処理で減少したタンパク質として X 相互作用タンパク質の一つである Z が同定された。この結果から、タンパク質 X とタンパク質 Z の相互作用が阻害された可能性が示唆された。さらに、抗 X 抗体を用いた IP サンプルのウエスタンブロットング解析を行ったところ、化合物 C によるタンパク質 X・タンパク質 Z 相互作用の阻害を確認することが出来た。

Induced-fit 型阻害剤によるアロステリックな X の構造変化を調べるために、X-C 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、C の結合により、X の Z 結合部位の構造変化が示唆された。この結果から、induced-fit 型 X 阻害薬 C は、X に induced-fit する際に、X の Z 結合部位の構造変化を引き起こすことにより、タンパク質 X・タンパク質 Z 相互作用を阻害することが示された。

薬効評価の一つとして、Neuro2a 細胞における神経突起伸長活性を調べた。その結果、化合物 A (非 induced-fit 阻害薬) に比べ化合物 C (induced-fit 阻害薬) 処理した Neuro2a 細胞では、顕著な神経突起伸長が見られた。

in vivo 薬効評価として、うつ病モデルマウスを用いた社交性試験、スクロース嗜好性試験を行った。うつ病モデルマウスとして社会性敗北ストレス負荷マウスを作成、使用した。社会性敗北ストレスモデルとうつ病患者の脳内遺伝子発現パターンは非常に似ていること (Li *et al.*, *Neuron* 2024 etc.)、社会性敗北ストレスモデルにおける薬剤応答性がうつ病患者と同様であること (Zanos *et al.*, *Nature* 2016 etc.) から、本研究では、社会性敗北ストレスモデルを用いた。induced-fit 型 X 阻害薬 B、C は、非 induced-fit 型阻害薬である A よりも顕著な抗うつ活性を示した。一方、B、C による体重減少や行動活性異常 (多動) といった毒性・異常行動は認められなかった。なお、本動物実験は、大学の生命倫理委員会の許可を得て行われた。

以上の結果から、induced-fit 型 X 阻害薬が抗うつ薬として有効であることが示されるとともに、神経突起伸長作用、モデルマウスでの社交性試験、スクロース嗜好性試験による抗うつ効果を指標として小分子の探索を行うことの妥当性も示すことができた。

つぎに、うつ病モデルマウスの側坐核において、induced-fit 型 X 阻害薬 C 投与で発現変動する細胞種マーカーを調べたところ、Neuron における *Camk2a* の発現低下、Microglia における *Cx3cr1* の発現上昇、Astrocytes における *Gdnf*、*Bmp7*、*Cav1/2* の発現上昇、Oligodendrocytes における *Gjb1* の発現上昇が確認され、Neuron だけではなく、C は様々な細胞種に影響する可能性が示された。

そこで、シングルセル RNA-seq を施行することで C による抗うつ作用を創発する細胞種と責任分子の探索を行った。既報通り、側坐核におけるメジャーな細胞種 (D1 細胞、D2 細胞など) にクラスターリングできたことから、各クラスター (細胞種) における発現変動遺伝子群を抽出した。その結果、うつ病モデル群と比較して C 投与群では、D1 Neuron、D2 Neuron、Oligodendrocytes、Microglia で多くの遺伝子の発現が変化し、特に、Microglia で発現変動している遺伝子数が顕著であることが分かった。つぎにパスウェイ解析を行ったところ、C 投与マウ

スの Microglia では、クロマチン構築、オートファジー、がん免疫関連のパスウェイ等が変化していることが示唆された。Microglia におけるパスウェイ解析で抽出した Top10 パスウェイでは、IL-27 シグナルの活性化やがん免疫に関わる PD-1 経路の不活性化がヒットした。C 投与で変動するこれらパスウェイに共通の遺伝子として、JAK2 の増加などが抽出されたことから、CS が Microglia における JAK2 の発現を増加させることで抗うつ効果を発揮している可能性が示唆された。今後、Microglia における JAK2 などに着目し、抗うつ作用との因果性を検証していくことで、Microglia による抗うつ作用メカニズムの解明ならびに JAK2 を標的とする新たな抗うつ薬の開発が期待できる。

以上の結果から、化合物 C の抗うつ薬としての可能性が示されたが、C の PK 解析を行ったところ、C は、経口投与で末梢暴露は良好であるものの脳移行性は十分ではないことが明らかとなった。そこで、C の構造を基に、分子内水素結合をもたせることにより分子の極性を下げ、血液脳関門 (BBB) 透過性の向上を期待した化合物を設計した。設計、合成した化合物をマウスに経口投与した際の脳移行性を調べたところ、化合物 D が化合物 C よりも高い脳移行性を示すことが明らかとなった。さらに、うつ病モデルマウスに対して、D あるいは C を 5mg/kg の濃度で経口投与し、行動評価を行った。その結果、D 投与マウスは社交性の回復とアンヘドニア症状の消失、即ち抗うつ作用を認めた。一方、C では抗うつ作用を認めなかった。以上の結果から、化合物 D は BBB 透過型 X 阻害剤として、抗うつ薬治療に有効である可能性が示唆された。

induced-fit 型 X-タンパク質相互作用阻害薬 D の抗うつ作用メカニズムを調べるため、網羅的なリン酸化プロテオミクスを行なった。Non-stress マウス (control, n = 3)、smSDS マウス (stressed, n = 3)、smSDS +阻害薬 D 処理マウス (n = 3) の脳からタンパク質を抽出してトリプシン消化、TMT (Tandem Mass Tag) ラベリ化、リン酸化ペプチド濃縮、ペプチド分画をして LC-MS/MS によりリン酸化ペプチドの同定と相対的定量、パスウェイ解析を行なった。その結果、smSDS マウスと SL-2 投与 smSDS マウスとの比較において 38 個のパスウェイが 2 回の実験で共通して同定された。そのうち、4 つのパスウェイの活性化が再現性よく同定された。以上の結果より、阻害薬 D の抗うつ作用メカニズムとして神経軸索の誘導 (L1CAM interactions) やシナプス形成 (Synaptogenesis Signaling Pathway) の活性化が示唆された。

(2) Induced-fit 型 Y-タンパク質相互作用阻害薬の創製

クリックケミストリーにより、既知の Y 阻害薬の誘導体群を 20 化合物合成し、速度論解析を行った。その結果、 $K_i = 17 \text{ nM}$ の induced-fit 型 Y 阻害薬 E を見出した

化合物 E は、神経細胞に対して毒性を示すことなく ($IC_{50} > 200 \text{ } \mu\text{M}$)、2 nM の濃度で神経突起伸長活性を示した。また、E について、ストレスを負荷したうつ病モデルマウスを用いて、神経細胞樹状突起スパイン密度亢進活性を評価した結果、E は、顕著な神経細胞樹状突起スパイン密度亢進活性を示し、スパイン密度を正常化させた。さらに、E の投与は社交性試験における抗うつ様行動を示した。一方、E による体重減少や行動活性異常といった毒性・異常行動は認められなかった。

つぎに、タンパク質 Y のホモログと化合物 E のドッキング計算を行い、それを基に化合物 E の環を変換し、疎水性相互作用を期待した化合物、Arg 残基との相互作用を期待した化合物を設計、合成した。これらの合成化合物の速度論解析を行った結果、化合物 F と化合物 G が induced-fit 型 Y 阻害薬であることが分かった。

Neuro2a 細胞における神経突起伸長活性を調べた結果、化合物 E に比べ化合物 F と化合物 G は、高い神経突起伸長活性を示した。さらに、うつ病モデルマウスを用いた社交性試験、スクロース嗜好性試験を行った結果、化合物 G 投与マウスはストレス負荷後にみられる社会性の低下とアンヘドニアの症状が消失していた。ゴルジ染色による神経細胞スパイン密度を定量解析したところ、化合物 G 投与マウスにおいて、ストレス負荷後にみられるスパイン密度の低下は消失していた。一方、化合物 G 投与による体重減少や行動活性に対する影響は認めなかった。以上のように、化合物 G による抗うつ作用が示唆された。

薬効メカニズム解析のために、うつ病モデルマウスの側坐核において、induced-fit 型 Y 阻害薬 G 投与で発現

変動する細胞種マーカーを調べたところ、Neuron における *Neurod1* の発現低下、*Sypl* の発現上昇、Microglia における *Rgs2*、*P2ry13* の発現低下、Astrocytes における *Gfap* の発現上昇、Oligodendrocytes における *Olig1/2* の発現上昇が確認され、Neuron だけではなく、G は様々な細胞種に影響する可能性が示された。

上述のように、少なくとも X 阻害薬においては、PPI を阻害する induced-fit 阻害薬が低い毒性で高い薬効を示すことを明らかにした。以上の結果を基に、低分子創薬化学における「アロステリック型 PPI 阻害」という新しい概念を提唱することができた。

Protein-protein interactions (PPIs) are central to the pathology of cancer, neuropsychiatric disorders, and many other diseases, yet the development of small molecule PPI inhibitors remains highly challenging because PPI interfaces are generally broad and shallow. In this study, we aimed to create a new class of allosteric PPI inhibitors that inhibit PPIs through an induced-fit mechanism, analogous to conventional allosteric inhibitors that distort enzyme active sites by binding to allosteric pockets. By applying this concept to targets relevant to neuropsychiatric disease, we sought to establish small molecules with neuronal selectivity and blood-brain barrier (BBB) permeability.

For protein X, a target implicated in neuropsychiatric disorders, we synthesized 20 click-chemistry derivatives of a known X inhibitor and evaluated their enzymatic inhibitory activity and kinetic behavior. Kinetic analysis identified one non-induced-fit inhibitor (A; $K_i = 7.2$ nM) and two induced-fit inhibitors (B; $K_i = 0.24$ nM, C; $K_i = 0.34$ nM). In Neuro2a cells, compound C disrupted the interaction between X and its partner Z, as shown by immunoprecipitation, TMT-based proteomic analysis, and western blotting. X-ray crystallography of the X–C complex further revealed that C induced an allosteric conformational change in X, leading to structural distortion of the Z-binding site and inhibition of the X–Z interaction. Functionally, compound C enhanced neurite outgrowth in Neuro2a cells and produced robust antidepressant-like effects in a social defeat stress mouse model, without causing weight loss or hyperlocomotion. Cell-type marker analysis in the nucleus accumbens suggested that C affected multiple cell populations, including neurons, microglia, astrocytes, and oligodendrocytes. Single-cell RNA-seq further showed that microglia exhibited the largest transcriptional response, and pathway analysis suggested involvement of chromatin regulation, autophagy, and immune-related pathways. Among the altered pathways, IL-27 signaling activation and PD-1 pathway inactivation were notable, and JAK2 emerged as a candidate effector molecule. Although C showed good peripheral exposure after oral administration, brain penetration was insufficient; therefore, we designed a derivative with reduced polarity via intramolecular hydrogen bonding. The resulting compound D displayed improved BBB penetration and retained antidepressant activity after oral dosing, whereas C did not.

For protein Y, another neuropsychiatric disease-related target, click-chemistry derivatization and kinetic analysis identified an induced-fit inhibitor, E ($K_i = 17$ nM). Compound E showed no neuronal toxicity and promoted neurite outgrowth at 2 nM. In a stress-induced depression model, E also restored dendritic spine density and improved social behavior without causing adverse effects. Structure-based optimization guided by docking studies led to compounds F and G, both of which were confirmed as induced-fit inhibitors. Among them, G showed the strongest neurite-promoting activity and produced clear antidepressant-like effects, including recovery of social behavior and normalization of spine density, again without detectable toxicity. Marker analysis in the nucleus accumbens indicated that G influenced neurons, microglia, astrocytes, and oligodendrocytes, suggesting a broad cellular mechanism of action.

Collectively, these findings demonstrate that induced-fit allosteric inhibition can be exploited to create small molecule PPI inhibitors with high potency, favorable safety, and in vivo antidepressant efficacy. This work establishes the concept of allosteric PPI inhibition as a promising new strategy in small-molecule drug discovery, particularly for CNS drug development.