

総説

化学合成タンパク質を利用したスクリーニング技術の開発 —鏡の中に存在する化合物リソースの創薬研究への応用—

大石真也*

京都薬科大学 薬品化学分野

創薬研究の対象となる標的タンパク質を組換え DNA 技術により簡便に調製できるようになり、高効率で医薬シーズ探索のためのスクリーニングの実施が可能になった。このような時代にあつて、化学合成によりタンパク質を調製することの価値はどこにあるのだろうか。現在組換え DNA 技術により調製できないタンパク質の 1 つに、全配列が D- アミノ酸からなる鏡像型タンパク質がある。著者らは、細胞増殖に關与する標的分子の鏡像型タンパク質の化学合成を行うとともに、これを鏡の中に存在する化合物リソースからの医薬シーズの探索研究に応用した。

キーワード：化学合成タンパク質，鏡像型タンパク質，鏡像体，鏡像スクリーニング，天然物

受付日：2021 年 7 月 31 日，受理日：2021 年 9 月 22 日

1. はじめに

15 年前のちょうど今ごろ，京都大学大学院薬学研究科の出身研究室（薬品有機製造学分野）に着任して研究する機会をいただいた著者は，化合物ライブラリーの整備というあまりなじみのない業務を担当することになった。前任地の静岡県立大学においてスクリーニング研究に従事した経験をふまえて任を与えられたものと理解できたが，主として医薬シーズの創製研究に取り組んできた著者としては，自分自身が具体

的に使う予定がない研究リソースの整備に時間を割くことにあまり前向きな気持ちにはなれなかった。本稿では，未来予測が難しかった状況から，多くの共同研究者のご支援をいただきながら取り組んできたスクリーニング技術の開発研究の経緯と概略を紹介する。

2. 大学の研究室で合成された化合物の活用

薬学系に限らず有機化学及びその関連領域の研究室では，日々の研究活動を通して多数の化合物が合成されている。化学合成に実際に携わった研究者であればこれらは貴重なサンプルに違いないが，長年にわたって倉庫の奥に収納

* 連絡先：

〒607-8412 京都府京都市山科区御陵四丁野町 1
京都薬科大学 薬品化学分野

されていた箱の中身はさまざまなサイズの容器に入った取り扱い困難なサンプルである(図1)。これらのサンプルをスクリーニング研究に用いるためには、生物活性評価を効率よく実施できるフォーマットに整備する必要があった。

著者らは、静岡県環境衛生科学研究所の小郷尚久博士(現・静岡県立大学)やテクニカルスタッフのご協力により、①統一サイズのバイアルに収納、②必要量のサンプルを秤量、③DMSO 溶液を調製、④プレートに分注することで、これらのサンプルをスクリーニング研究に使える仕様に整備した。また、これと並行して、元の容器に貼られたラベルを1つずつ確認しながら、化学構造をデータベースに登録する作業を、大学院生らの協力により行った。古いラベルに描かれた化学構造は、経年劣化で識別が難しいものや最近では使われない表記のものもあったが、丁寧にこれらを確認しながら作業を進めていくと、過去の研究の流れに基づく化学



図1 有機系研究室で合成された古い化合物の保存形態

実際に合成に携わった研究者にとっては思い入れのある貴重なサンプルであるが、長期間経過後に実験台の下から出てきた時点では容易に廃棄することができない厄介者である(産業廃棄物としての適切な処理が必要)。プラスチック(ポリエチレン)製のフタは長期保管には不適切であり、古いサンプル管のフタを開けようとするとかかなりの高確率で破損する。サンプルの有効活用を意図するのであれば、長期保存に耐えうる容器に統一のフォーマットで整理することが望ましい。

構造の特徴などを把握することができた。すなわち、ドラッグライク(薬らしい)構造と言える化合物は多くないものの、スクリーニングの用途で市販されている化合物とは違ってキラルな化合物が多い特徴があった。

この化合物ライブラリーの整備は、その後、文部科学省の委託事業の一部として採択され、ライブラリーの充実や利用の拡大が図られた。この委託事業では他研究機関との連携により複数の共同研究を展開したが、このうちの1つとして、上述の過程で京都大学に整備した in-house ライブラリー化合物を理化学研究所でのスクリーニングに応用する研究を行った。

理化学研究所の長田裕之博士らは、天然物をはじめとするさまざまな有機化合物をガラス基板上のスポットに固定し、これに標的タンパク質を作用させて結合活性を評価する化合物アレイ技術を開発している¹⁾。このスポットの表面には光親和性官能基が提示されており、光照射下で発生するカルベンの反応性を活かして化合物が固定される。このため、各化合物はさまざまな結合モードでガラス基板上に固定され、アレイ表面には化合物中の多様な部分構造が提示されていると考えられている。ここに蛍光標識タンパク質(もしくは、標的タンパク質とこれに対する蛍光抗体)を作用させると、タンパク質への結合活性がある化合物のスポットにおいてのみ、蛍光が観察される。この化合物アレイ技術によるスクリーニングの利点は、最少量のタンパク質を準備すれば、多数の化合物との結合を一度に評価できることである²⁾。著者は、この共同研究を契機として、著者らが専門とするペプチド・タンパク質の化学合成技術を組み合わせることで、新しいスクリーニングシステムの確立を目指した取り組みを開始した。

3. キラルな天然物の鏡像体の 仮想的なスクリーニングへの展開

天然物は、古くから利用されてきた魅力的な医薬探索のリソースである。自然界に存在する動植物などから単離・構造決定された天然物が臨床応用されるとともに、構造改変等を経てより優れた生物活性プロファイルを持つ医薬品が創製されている。一般に、天然から得られるこれらの素材は、自然界に存在する立体異性体のみが創薬研究に利用されることが多く、自然界に存在しない異性体を探索リソースとして利用することは難しい(図2)。また、先述のように、大学における研究活動で合成された化合物は、一方の立体異性体のみが合成・保存されているケースが多く、他方の異性体をスクリーニングリソースとして利用するためにはこれらの一連の化合物群を改めて化学合成する必要がある。著者らは、天然物をはじめとするキラルな化合物の鏡像体の生物活性を簡便に知るための技術を確立できれば、現有のリソースにはない鏡像体化合物群が新たな医薬シーズとなり得ると考え、以下の計画を立てた(図3)。

まず、標的タンパク質の鏡像体(鏡像型タンパク質)を化学合成する(①)。標的タンパク

質の全配列をD-アミノ酸により合成することで、その立体構造は自然界にあるタンパク質(天然型タンパク質)の鏡像構造となる。次に、この鏡像型タンパク質を用いて、天然物をはじめとする現有のキラル化合物のスクリーニングを行う(②)。このスクリーニングにより得られるヒット化合物は鏡像型タンパク質に対する作用を示すものである。この天然型タンパク質への作用が期待されるヒット化合物の鏡像体を化学合成する(③)。最後に、このヒット化合物の鏡像体が天然型タンパク質に対する生物活性を示すことを確認する(④)。この鏡像スクリーニングのプロセスでは、キラル化合物の鏡像体をスクリーニングリソースとして準備する必要はなく、現有のキラル化合物をそのまま利用できるメリットがある。一方で、「標的タンパク質の鏡像体」と「ヒット化合物の鏡像体」という2つの物質の化学合成が必要となる。

なお、この鏡像スクリーニングのコンセプトは、これまでにD-アミノ酸からなるペプチド(D-ペプチド)やL-リボースからなるRNA(L-RNA)の探索に利用されてきた実績がある^{3,4)}。これらのD-ペプチドやL-RNAを探索するためのスクリーニングでは、ディスプレイ技術によりシグナルを増幅して活性配列を特定すること

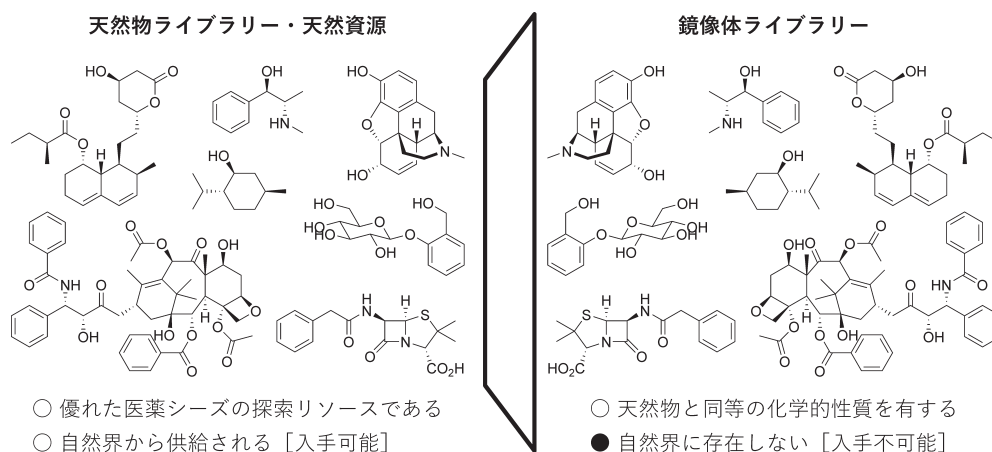


図2 キラルな天然物とその鏡像体化合物

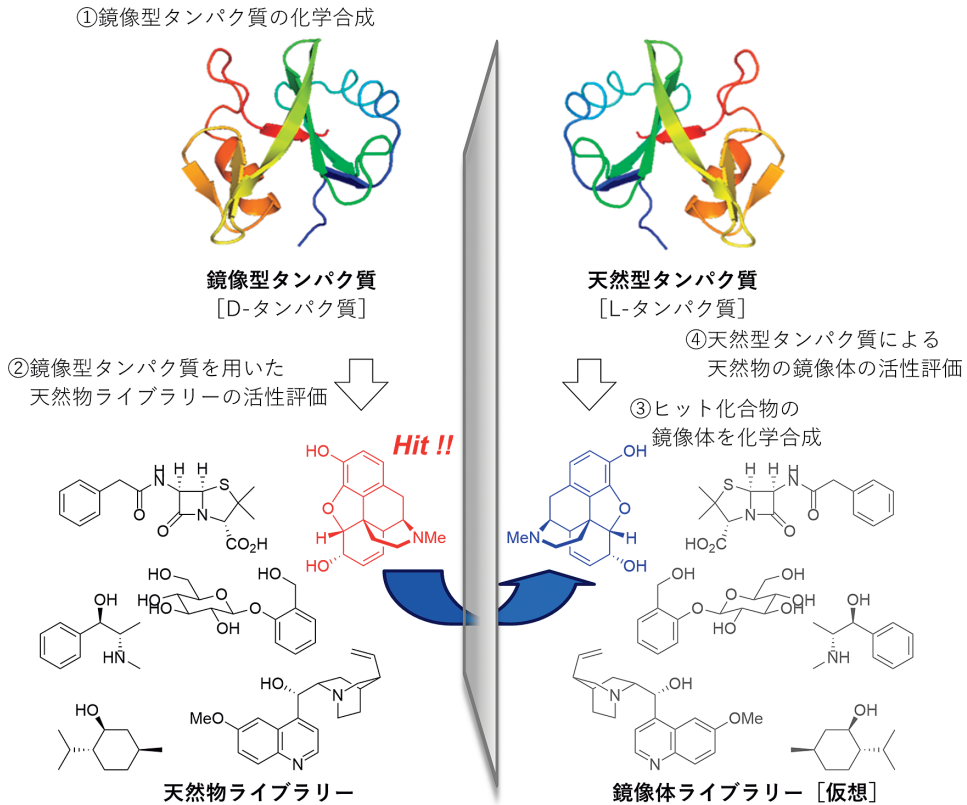


図3 天然物の鏡像体化合物群からの仮想的なスクリーニングのプロセス

が可能である。例えば、フェージディスプレイ法では、1回のアッセイで 10^8 種類以上のペプチド鎖の標的分子への結合を同時に評価することが可能であり、ごく微量のヒットしたペプチド配列の情報をPCRにより増幅して確認することができる。一方で、天然物をはじめとする有機化合物を探索リソースとする通常のスクリーニングでは、化合物—タンパク質間の結合シグナルを増幅して検出することが難しい。すなわち、結合シグナルを検出するために相当量の化合物と標的タンパク質のサンプルを消費することから、可能な限り小さなスケールで生物活性を評価できるシステムが望ましい。こうした観点から、著者らは、キラルな天然物の鏡像体の探索を目指したスクリーニングでは、アレイ上に固定された少量の天然物に対して、少量

の鏡像型タンパク質を作用させることでその生物活性評価が可能な化合物アレイ解析技術を採用した。

以下では、著者らが実際に取り組んだ鏡像スクリーニングのための鏡像型タンパク質の合成とこれを利用したスクリーニングの例について紹介する。

4. MDM2の化学合成とスクリーニングへの応用

MDM2は、細胞増殖を抑制する機能を持つp53タンパク質の負の調節因子であり、MDM2—p53相互作用を阻害する化合物はがんをはじめとする様々な疾患に対する医薬シーズとして期待されている⁵⁾。著者らは、MDM2のp53結合ド

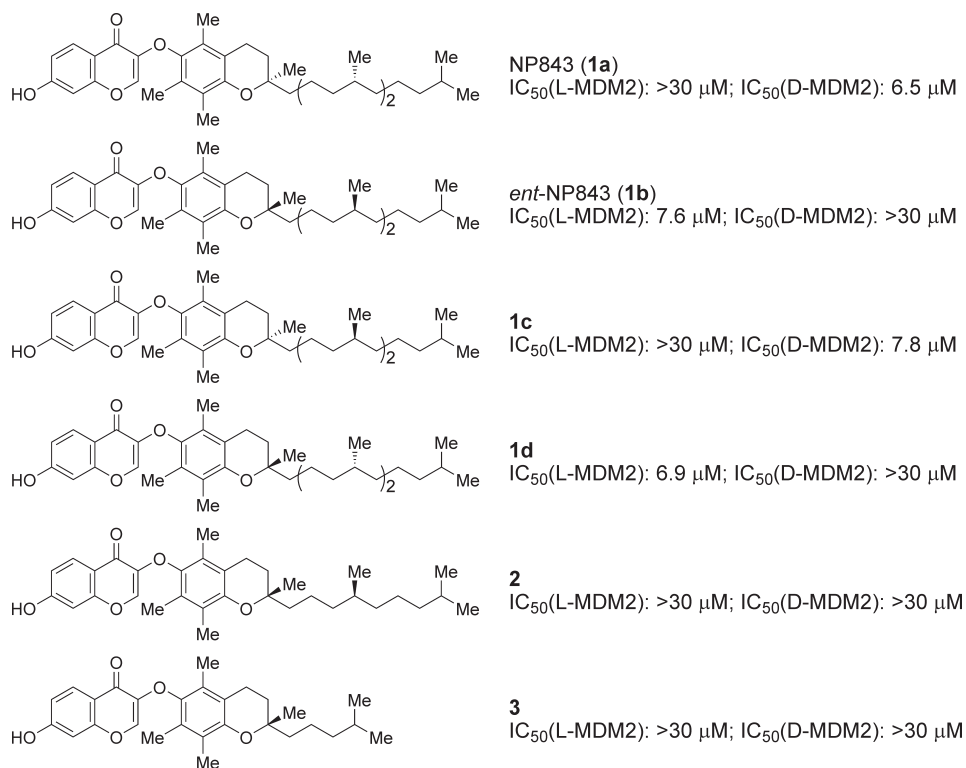


図4 MDM2-p53 阻害剤の探索研究により得られたヒット化合物の構造活性相関

メイン (MDM2²⁵⁻¹⁰⁹) の化学合成の先例⁶⁾を参考にして、キラルな天然物の鏡像体からの医薬品シーズの探索の実証研究を行った。先行研究では、全長を2つに分割したペプチドセグメントを固相合成により調製した後、これらを native chemical ligation (NCL) に付して MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ を化学合成していた。著者らは、より簡便に MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ を調製するべく固相合成に用いる樹脂などを最適化し、85 残基からなる全長を固相樹脂上で構築する条件を確立した⁷⁾。化合物アレイ解析に用いる蛍光標識タンパク質や D-アミノ酸からなる鏡像型タンパク質も同様のプロセスで得た。

約 22,000 化合物からなる天然物ライブラリー (天然物誘導体、アキラルな化合物なども含む) の L-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ 及び D-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ への結合活性を化合物アレイ解析により評価した。続いて、

結合活性が認められた化合物について、L-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ - L-p53 相互作用及び D-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ - D-p53 相互作用に対する阻害活性を評価したところ、複数のヒット化合物を同定した。このうち、ビタミン E 誘導体 NP843 (**1a**) のみが、D-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ - D-p53 相互作用を選択的に阻害した。最後に、NP843 の鏡像体 (*ent*-NP843: **1b**) を化学合成し、*ent*-NP843 が L-MDM2²⁵⁻¹⁰⁹ - L-p53 相互作用 (天然型タンパク質の相互作用) を選択的に阻害することを確認した⁸⁾。

ヒット化合物として得られた *ent*-NP843 には、3 箇所の不斉炭素原子が存在する。著者らは、ヒット化合物の特異性や阻害活性に寄与する立体配置を精査する目的で、いくつかの誘導体を合成して、構造活性相関を取得した (図 4)。すなわち、クロマン骨格上の立体配置と側鎖上の 2 つのメチル基の立体配置が異なる計 4 種類

の立体異性体 (**1a-d**) を比較したところ、MDM2 - p53 阻害活性にはクロマン骨格上の立体配置が重要であることが示唆された。また、側鎖のイソプレヌユニットの鎖長が異なる誘導体 (**2** 及び **3**) との比較により、3つのイソプレヌユニットが必要であることが示唆された。以上のプロセスにより、鏡像スクリーニングからヒット化合物の鏡像体の化学合成を経て、MDM2 - p53 相互作用に対する阻害活性を示す天然物 (誘導体) の鏡像体を取得することができた。

このスクリーニングの過程では、単一の立体異性体の化合物としてデータベース上に登録されているにも関わらず、L-MDM2 と D-MDM2 の両方に作用するヒット化合物も得られている。このうち、NPD6878 (*R*-(*-*)-アポモルヒネ) は、MDM2 - p53 相互作用に対する比較的強力な阻害活性を示した。アッセイ溶液が青色に変化していくことに着目してその成分を解析すると、*R*-(*-*)-アポモルヒネの酸化により得られるオキソアポモルヒネであることが判明した⁹⁾。引き続き、アッセイ直前に調製した *R*-(*-*)-アポモルヒネと別途合成したオキソアポモルヒネのそれぞれを MDM2 - p53 阻害活性を評価すると、オキソアポモルヒネのみに阻害活性が認められた。また、質量分析や MDM2 の変異体を用いた生物活性評価により、オキソアポモルヒネは MDM2 の Cys77 と共有結合することで阻害活性を示すことを明らかにした。この結果は当初想定していたものではなかったが、天然型タンパク質と鏡像型タンパク質を用いたアッセイを並行して行うことで、ヒット化合物の特性に関する新たな知見を得ることができた。

5. SH2 ドメインの化学合成とスクリーニングへの応用

Src homology 2 ドメイン (SH2 ドメイン) は、

リン酸化を受けたチロシン (リン酸化チロシン) とその周辺の数残基からなるアミノ酸配列を認識する約 100 残基からなるタンパク質ドメインである¹⁰⁾。SH2 ドメインを含むタンパク質は、ヒトでは 100 種類以上のものが知られており、細胞内のシグナル伝達系において重要な役割を果たしている。著者は、2003 年からの約 1 年間にわたる留学期間中に、Grb2 SH2 ドメインに対する阻害剤の研究に従事していた¹¹⁻¹⁵⁾。すなわち、リン酸化チロシンを模倣したアミノ酸誘導体を含む複数の分子を設計し、Grb2 SH2 ドメインに対する強力な結合親和性を示す阻害剤を創製している。著者らは、この経験を参考にして、標的である SH2 ドメインタンパク質の化学合成に取り組むことに興味を持ち、鏡像スクリーニングによる SH2 ドメイン阻害剤の探索を試みることにした。

Grb2 SH2 ドメイン (Grb2⁵³⁻¹⁵⁴) は、3つのペプチドセグメントを NCL で連結することにより合成した (図 5)。(予備検討では 2つのペプチドセグメントからの合成が可能であることを確認していたが、各セグメントの合成収率が著しく低かったため改良を加えた。ペプチドの固相合成では、一般に鎖長が長いほどペプチドの合成収率が低減する。また、短鎖ペプチドであっても配列によっては、期待ほどの収率で目的のペプチドが得られないことがある。適切な収率で所望のペプチドが得られない場合には、用いる試薬や合成プロセスなどを改良する必要がある。) ペプチドヒドラジドからチオエステルを調製後、N 末端側からペプチドセグメントを順次連結する新しい NCL の手法¹⁶⁾ と脱硫反応 (metal-free desulfurization: MFD)¹⁷⁾ を利用することで、効率よく Grb2⁵³⁻¹⁵⁴ を化学合成するプロセスを確立した¹⁸⁾。

Src SH2 ドメイン (Src¹⁴⁵⁻²⁵¹) は、Cys188 を利用した NCL により、2つのペプチドセグメントから全長を構築する計画を立てた (図 6)。

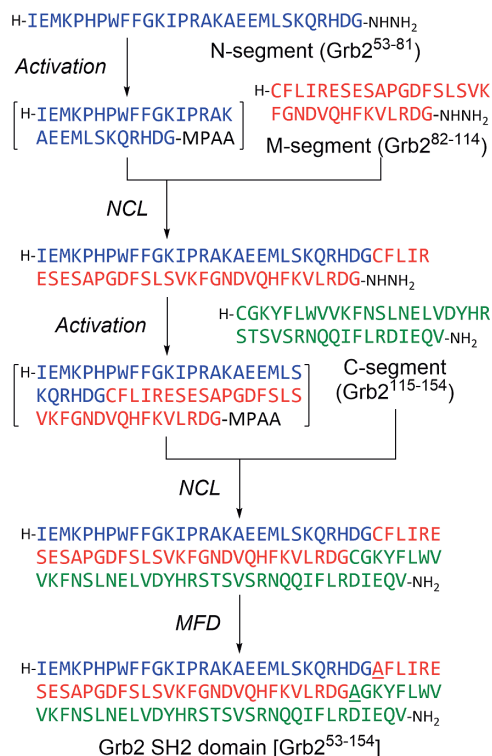


図5 Grb2 SH2 ドメインの化学合成

まず、N 末端セグメントに相当するペプチド鎖 (Src¹⁴⁵⁻¹⁶⁷) を Dawson リンカー上で構築し、チオエステルへと変換した。これを C 末端セグメント (Src¹⁶⁸⁻²⁵¹) との NCL に付し、目的の Src¹⁴⁵⁻²⁵¹ の合成プロセスを確立した¹⁹⁾。

得られた 2 つの SH2 ドメインタンパク質は、それぞれ変性処理の後、緩衝液への透析処理を行うことで、活性型タンパク質とした。また、表面プラズモン共鳴 (SPR) 解析により、リン酸化チロシンを含むペプチドとの立体選択的な相互作用を示すことを確認した。すなわち、L-Grb⁵³⁻¹⁵⁴ 及び L-Src¹⁶⁸⁻²⁵¹ は、それぞれ L-EGFR¹⁰⁶⁰⁻¹⁰⁷⁶ 及び L-hmT pY324 と結合した。同様に、D-Grb⁵³⁻¹⁵⁴ 及び D-Src¹⁶⁸⁻²⁵¹ は、それぞれ D-EGFR¹⁰⁶⁰⁻¹⁰⁷⁶ 及び D-hmT pY324 と結合することを確認した。SH2 ドメインタンパク質は、組換えタンパク質から作成したペプチドセグメントを利用した半合成の例が報告されていたも

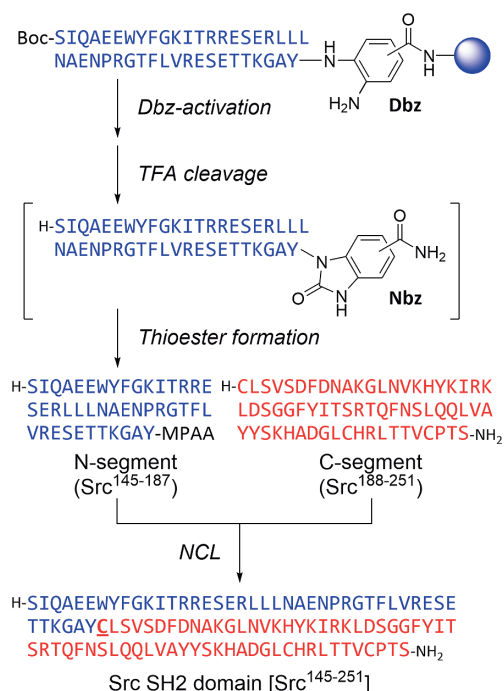


図6 Src SH2 ドメインの化学合成

の²⁰⁾、アミノ酸からの完全化学合成は報告例がなく、この取り組みによりさまざまな SH2 ドメインタンパク質の鏡像型タンパク質の合成に応用可能なプロセスを確立することができた。

引き続き、取得した活性型の化学合成タンパク質を利用して、天然物のスクリーニングを行った。化合物アレイ解析を用いた約 29,000 化合物のスクリーニングにより、D-Grb⁵³⁻¹⁵⁴ 選択的に結合する 503 種類のヒット化合物を同定した。また、約 22,000 種類の化合物のスクリーニングにより、D-Src¹⁶⁸⁻²⁵¹ 選択的に結合する 108 種類のヒット化合物が得られた。しかしながら、これらのヒット化合物は、D-Grb⁵³⁻¹⁵⁴ - D-EGFR¹⁰⁶⁰⁻¹⁰⁷⁶ 相互作用や D-Src¹⁶⁸⁻²⁵¹ - D-hmT pY324 相互作用に対する阻害活性を示さず、残念ながら期待していたリン酸化チロシンを認識するポケットに作用する阻害剤を得るには至らなかった。本研究で用いた化合物ライブラリーからは所望の阻害剤を取得することはできな

かったものの、スクリーニング化合物の数を増やしたり、別のカテゴリーの化合物群に展開するなどの工夫により、これらの SH2 ドメインタンパク質に対する生物活性評価系はキラル化合物からのリード化合物の探索に利用可能である。

6. BIR ドメインの化学合成とスクリーニングへの応用

Baculovirus IAP repeat ドメイン (BIR ドメイン) は、アポトーシス阻害因子 (inhibitors of apoptosis: IAP) ファミリーのタンパク質に存在する約 70 残基からなるドメイン構造である。このうち、XIAP BIR3 ドメインは、X-linked IAP (XIAP) の配列中の 3 番目にある BIR ドメインで、カスパーゼ -9 や second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC) に結合してその機能を阻害し、アポトーシスを妨げることが知られている。このため、IAP の機能を阻害する化合物は抗がん剤として利用可能であると期待されており、さまざまな創薬研究が展開されている^{21, 22)}。著者らは、XIAP BIR3 ドメインに対する阻害剤を天然物の鏡像スクリーニングにより探索することを目的として、XIAP BIR3 ドメインタンパク質の合成研究に取り組んだ²³⁾。

XIAP BIR3 ドメインタンパク質 (XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶) の 116 アミノ酸を 3 つのセグメントに分割し、C 末端側からの NCL により全長を連結する計画を立てた。しかしながら、N 末端セグメント XIAP²⁴¹⁻²⁹⁹ (59 残基) の固相合成による収率が著しく悪かったため、このセグメントをさらに 2 つ (XIAP²⁴¹⁻²⁶² 及び XIAP²⁶³⁻²⁹⁹) に分割して、計 4 つのセグメントからの合成を検討した (図 7)。まず、Dawson リンカー上で構築した N1 セグメント (XIAP²⁴¹⁻²⁶²) からチオエステルを調製した後、N2 セグメント (XIAP²⁶³⁻²⁹⁹) との NCL を行い、Cys263 の脱硫反応を経て XIAP²⁴¹⁻²⁹⁹ を取得した。同様に、Dawson リンカー上で構築

した中間セグメント (XIAP³⁰⁰⁻³²⁶) からチオエステルを調製した後、C 末端セグメント (XIAP³²⁷⁻³⁵⁶) との NCL により、XIAP³⁰⁰⁻³⁵⁶ を取得した。最後に、XIAP²⁴¹⁻²⁹⁹ のヒドラジドを活性化してチオエステルへと変換した後、XIAP³⁰⁰⁻³⁵⁶ との NCL により、XIAP BIR3 ドメインタンパク質の全長を取得した。蛍光標識タンパク質や鏡像型タンパク質も同様のプロセスにより合成した。

得られた全長タンパク質を既報²⁴⁾ の方法によるフォールディング処理に付した後、CD スペクトル解析により、L-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ と D-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ が対掌型の構造をとっていることを確認した。また、SMAC の N 末端ペプチドとの結合を SPR 解析により評価したところ、それぞれ立体選択的な相互作用を示すことを確認した。以上のプロセスを経て、これまでに報告例のない BIR ドメインタンパク質の化学合成を達成し、活性型タンパク質を取得できることを明らかにした。

引き続き、L-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ 及び D-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ の蛍光標識タンパク質を用いて、化合物アレイ解析により天然物ライブラリーのスクリーニングを行った。約 22,000 化合物のうち、D-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ に選択的に結合する 127 種類のヒット化合物が得られた。しかしながら、これらの D-XIAP²⁴¹⁻³⁵⁶ - D-SMAC 相互作用に対する阻害活性を評価したところ、期待された阻害活性を示すものは得られなかった。SH2 ドメイン阻害剤のスクリーニングのケースと同様であるが、期待された XIAP BIR3 ドメインの SMAC 結合部位に作用するものではない化合物が化合物アレイ解析においてヒットしていたものと考えられる。現在一次スクリーニングとして利用している化合物アレイ解析では、所望のサイト以外にも結合する化合物が多数同定されるため、これらを低減して真のヒット化合物を取得する効率を向上することが今後の課題である。

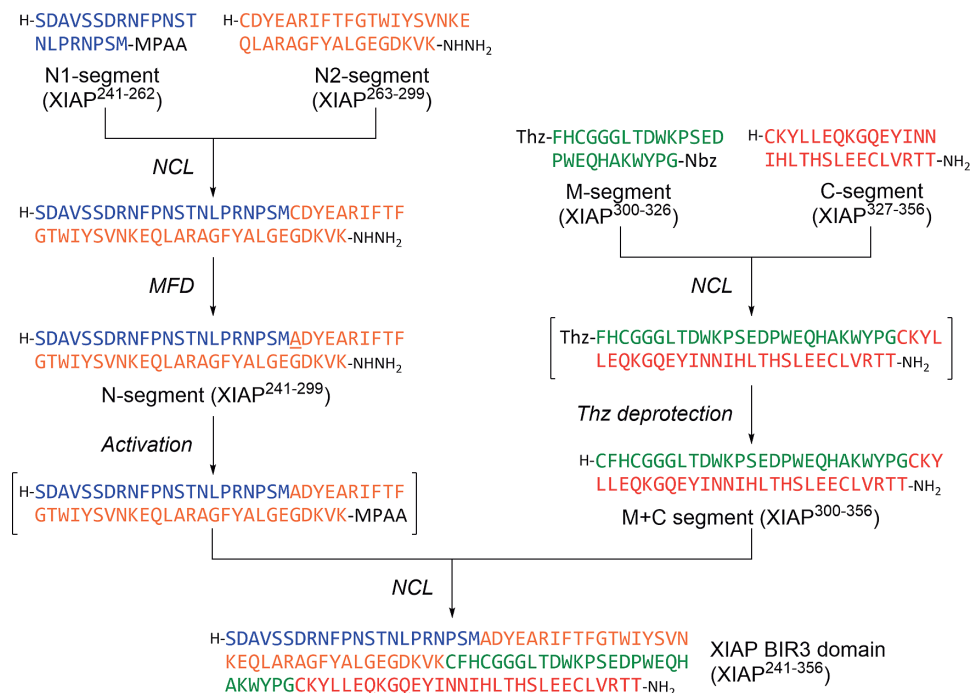


図7 XIAP BIR3 ドメインの化学合成

7. おわりに

本稿では、著者らがこの15年ほどの期間に取り組んできたスクリーニング研究の一端を紹介した。この一連の研究のアイデアは、研究支援に関わる事業においてさまざまな共同研究者が保有していた技術やリソースなどを目にする機会から産まれたものである。共同研究におけるサポート側の役割は、多くの場合目立たないわりに責任が重く、しばしば担当を引き受けることを躊躇しがちになるが、自身の専門領域とは異なる最先端の科学や技術に触れる有益な機会となる、と著者は実感することができた。いくつかの標的分子のスクリーニング結果を公表してからは、多くの研究者からコメントや評価をいただくことができるようになり、さらに研究の展開が広がりつつある。

近年、鏡像型タンパク質は、スクリーニング

研究に限らず、タンパク質の構造解析や生命現象の解明などの用途でも利用されるようになった²⁵⁾。しかしながら、化学合成可能なタンパク質の分子サイズには制約があり、また、適切なフォールディング構造からなる活性型タンパク質を取得するのは必ずしも容易ではない。すなわち、アミノ酸配列によっては所望のNCLが進行せずに全長の配列を構築できなかったり、無数のフォールディング条件を検討しても活性型タンパク質を取得できないケースがあり、未だに化学合成によるタンパク質の調製自体が研究課題となる段階である。今後の技術開発を通してさまざまなタンパク質の化学合成をより簡便に行うことが可能になれば、創薬に向けたスクリーニングの可能性が広がるだけでなく、生命科学の発展に寄与することが期待される²⁶⁾。著者らは、現在、本稿で紹介したタンパク質間相互作用に関与する標的タンパク質以外にも、酵素をはじめとする機能を持ったタ

ンパク質の合成に取り組んでおり、鏡の中の世界に存在する物質を利用した医薬シーズの探索に応用したいと考えている。

【謝辞】

本研究は、著者の前所属である京都大学大学院薬学研究科 ケモゲノミクス・薬品製造学分野において行われたものです。本研究を進めるにあたり、ご支援を賜りました藤井信孝名誉教授、大野浩章教授、共同研究者として研究を進めていただいた野口太朗博士、周敬棠博士、石場勲之氏、岩本直也氏をはじめとして、研究にご協力いただいた大学院生の皆さまに感謝申し上げます。また、本研究における化合物アレイ解析によるスクリーニングは、理化学研究所・環境資源科学研究センターの長田裕之博士、斎藤臣雄博士、近藤恭光博士、本田香織氏のご協力により行われたものであり、ここに深く感謝申し上げます。

【引用文献】

- 1) Naoki Kanoh, Saori Kumashiro, Siro Simizu, Yasumitsu Kondoh, Satoru Hatakeyama, Hideo Tashiro, Hiroyuki Osada. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein–small-molecule interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(45), 5584–5587.
- 2) Yasumitsu Kondoh, Kaori Honda, Hiroyuki Osada. Construction and application of a photo-cross-linked chemical array. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1263, 29–41.
- 3) Le Zhao, Wuyuan Lu. Mirror-image proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 22, 56–61.
- 4) Brian E. Young, Nandini Kundu, Jonathan T. Sczepanski. Mirror-image oligonucleotides: history and emerging applications. *Chem. Eur. J.* **2019**, 25(34), 7981–7990.
- 5) Wei Wang, Jiang-Jiang Qin, Mehrdad Rajaei, Xin Li, Xiaoyi Yu, Courtney Hunt, Ruiwen Zhang. Targeting MDM2 for novel molecular therapy: beyond oncology. *Med. Res. Rev.* **2020**, 40(3), 856–880.
- 6) Marzena Pazgier, Min Liu, Guozhang Zou, Weirong Yuan, Changqing Li, Chong Li, Jing Li, Juahdi Monbo, Davide Zella, Sergey G. Tarasov, Wuyuan Lu. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2009**, 106(12), 4665–4670.
- 7) Taro Noguchi, Shinya Oishi, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, Tatsuhiko Kubo, Masato Kaneda, Hiroaki Ohno, Hiroyuki Osada, Nobutaka Fujii. Affinity-based screening of MDM2/MDMX-p53 interaction inhibitors by chemical array: identification of novel peptidic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23(13), 3802–3805.
- 8) Taro Noguchi, Shinya Oishi, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, Hiroaki Ohno, Hiroyuki Osada, Nobutaka Fujii. Screening of a virtual mirror-image library of natural products. *Chem. Comm.* **2016**, 52(49), 7653–7656.
- 9) Hiroyuki Ishiba, Taro Noguchi, Keitou Shu, Hiroaki Ohno, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Hiroyuki Osada, Nobutaka Fujii, Shinya Oishi. Investigation of the inhibitory mechanism of apomorphine against MDM2–p53 interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27(11), 2571–2574.
- 10) Dziyana Kraskouskaya, Eugenia Duodu, Carolyn C. Arpin, Patrick T. Gunning. Progress towards the development of SH2 domain inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42(8), 3337–3370.
- 11) Shinya Oishi, Sang-Uk Kang, Hongpeng Liu, Manchao Zhang, Dajun Yang, Jeffrey R. Deschamps, Terrence R. Burke, Jr. Synthesis of α,α -disubstituted 4-phosphonophenylalanine analogues as conformationally-constrained phosphotyrosyl mimetics. *Tetrahedron.* **2004**, 60(13), 2971–2977.
- 12) Shinya Oishi, Zhen-Dan Shi, Karen M. Worthy, Lakshman K. Bindu, Robert J. Fisher, Terrence R. Burke, Jr. Ring-closing metathesis of C-terminal allylglycine residues with an N-terminal β -vinyl-substituted phosphotyrosyl mimetic as an approach to novel Grb2 SH2 domain-binding macrocycles. *ChemBioChem.* **2005**, 6(4), 668–674.
- 13) Shinya Oishi, Rajeshri G. Karki, Sang-Uk Kang, Xiangzhu Wang, Karen M. Worthy, Lakshman K. Bindu, Marc C. Nicklaus, Robert J. Fisher, Terrence R. Burke, Jr. Design and synthesis of conformationally constrained Grb2 SH2 domain binding peptides employing γ -methylphenylalanyl based phosphotyrosyl mimetics. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(3), 764–772.
- 14) Shinya Oishi, Rajeshri G. Karki, Zhen-Dan Shi, Karen M. Worthy, Lakshman Bindu, Oleg Chertov, Dominic Esposito, Peter Frank, William K. Gillette, Melissa Maderia, James Hartley, Marc C. Nicklaus, Joseph J.

- Barchi, Jr., Robert J. Fisher, Terrence R. Burke, Jr. Evaluation of macrocyclic Grb2 SH2 domain-binding peptide mimetics prepared by ring-closing metathesis of C-terminal allylglycines with an N-terminal β -vinyl-substituted phosphotyrosyl mimetic. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13(7), 2431–2438.
- 15) Sang-Uk Kang, Won Jun Choi, Shinya Oishi, Kyeong Lee, Rajeshri G. Karki, Karen M. Worthy, Lakshman K. Bindu, Marc C. Nicklaus, Robert J. Fisher, Terrence R. Burke, Jr. Examination of acylated 4-aminopiperidine-4-carboxylic acid residues in the pTyr + 1 position of Grb2 SH2 domain-binding tripeptides. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(8), 1978–1982.
- 16) Ge-Min Fang, Yi-Ming Li, Fei Shen, Yi-Chao Huang, Jia-Bin Li, Yun Lin, Hong-Kui Cui, Lei Liu. Protein chemical synthesis by ligation of peptide hydrazides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50(33), 7645–7649.
- 17) Matthew T. Weinstock, Michael T. Jacobsen, Michael S. Kay. Synthesis and folding of a mirror-image enzyme reveals ambidextrous chaperone activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2014**, 111(32), 11679–11684.
- 18) Taro Noguchi, Hiroyuki Ishiba, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Hiroyuki Osada, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Shinya Oishi. Synthesis of Grb2 SH2 domain proteins for mirror-image screening systems. *Bioconjug. Chem.* **2017**, 28(2), 609–619.
- 19) Keitou Shu, Taro Noguchi, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Hiroyuki Osada, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Shinya Oishi. Synthesis of the Src SH2 domain and its application in bioassays for mirror-image screening. *RSC Adv.* **2017**, 7(61), 38725–38732.
- 20) Satpal Virdee, Derek Macmillan, Gabriel Waksman. Semisynthetic Src SH2 domains demonstrate altered phosphopeptide specificity induced by incorporation of unnatural lysine derivatives. *Chem. Biol.* **2010**, 17(3), 274–284.
- 21) Simone Fulda, Domagoj Vucic. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2012**, 11(2), 109–124.
- 22) Hui Cong, Lijuan Xu, Yougen Wu, Zhuo Qu, Tengfei Bian, Wannian Zhang, Chengguo Xing, Chunlin Zhuang. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists in anticancer agent discovery: current status and perspectives. *J. Med. Chem.* **2019**, 62(12), 5750–5772.
- 23) Keitou Shu, Naoya Iwamoto, Kaori Honda, Yasumitsu Kondoh, Hiroyuki Hirano, Hiroyuki Osada, Hiroaki Ohno, Nobutaka Fujii, Shinya Oishi. Development of mirror-image screening systems for XIAP BIR3 domain inhibitors. *Bioconjug. Chem.* **2019**, 30(5), 1395–1404.
- 24) Laura E. Luque, Katrina P. Grape, Matthew Junker. A highly conserved arginine is critical for the functional folding of inhibitor of apoptosis (IAP) BIR domains. *Biochemistry.* **2002**, 41(46), 13663–13671.
- 25) Stephen B. H. Kent. Novel protein science enabled by total chemical synthesis. *Protein Sci.* **2019**, 28(2), 313–328.
- 26) Fabian Rohden, Jörg D. Hoheisel, Hans-Joachim Wieden. Through the looking glass: milestones on the road towards mirroring life. *Trends Biochem. Sci.* **2021**, 46(11), 931–943.