

総説

# マイオスタチン阻害分子の小型化は どこまで可能か

高山健太郎\*

京都薬科大学 衛生化学分野

マイオスタチンは骨格筋量を負に制御する生体内因子であり、筋ジストロフィーをはじめとする筋萎縮性疾患の治療標的として注目されている。マイオスタチン前駆体由来プロドメインタンパク質は、マイオスタチンと相互作用することで内因性のマイオスタチン阻害分子として働くことが知られており、筆者らはこの生来の阻害機構に着眼し、マイオスタチンに対するより小さな合成ペプチド阻害剤の獲得を目指した。マイオスタチンのアクチビンI型受容体結合部位と相互作用するプロドメインのN末端領域がかねてより着目されていた中、筆者らはマウス配列由来の23残基ペプチド**1**が効果的な阻害を示す最小構造であることを突き止めた。本ペプチド**1**を基に構造活性相関研究を展開し、ペプチド**1**の分子機能解明、阻害能の向上、更に16残基ペプチドへの小型化に成功した。また、コンピュータモデリングによるペプチド**1**の作用機構提唱にも至っており、新規阻害分子のデザインが今後加速することが期待される。

キーワード：構造活性相関、タンパク質間相互作用、分子機能解明、ペプチド、マイオスタチン

受付日：2021年7月31日、受理日：2021年8月5日

## 1. はじめに

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ スーパーファミリーに属するマイオスタチン（別名：growth differentiation factor-8, GDF-8）は、1997年にMcPherronらにより発見され、I型およびII型の2つのアクチビン受容体を介して主に骨格筋量の増加に対して抑制的に機能する<sup>1)</sup>。マイオスタチンを全身性に過剰発現させると骨格筋量減少などのカヘキシア症状を呈する一方、マイオスタチンを遺伝的に欠損させると約

2倍にも及ぶ劇的な筋量増加が起こる<sup>1,2)</sup>。即ち、マイオスタチン阻害剤は、筋ジストロフィーやサルコペニア、がん悪液質などの筋萎縮病態を克服するための治療薬となる可能性を有している。これまでに、抗マイオスタチン抗体やアクチビンII型受容体のデコイタンパク質など、高分子量医薬を軸とした創薬が進められているが、現時点ではいずれも臨床応用に至っていない<sup>3-8)</sup>。2017年にMariotらによりマイオスタチン阻害に関する創薬戦略の練り直しが提案されており<sup>9)</sup>、最近では、マイオスタチン単独阻害ではなく、アクチビンなど複数のTGF- $\beta$ スーパーファミリー因子の阻害が重要であることが明らかとなってきた<sup>10-13)</sup>。具体的には、抗アクチビン抗体の併用や、フォリスタチン関連タン

\*連絡先：  
〒607-8414 京都市山科区御陵中内町5  
京都薬科大学 衛生化学分野

パク質の利用が挙げられる。フォリスタチンは、マイオスタチンやアクチビンを含むTGF- $\beta$ スーパーファミリーに対する内因性阻害分子であり、血清や各組織に広くその存在が確認される糖タンパク質として知られている<sup>14,15)</sup>。

このように近年の創薬において基軸の一つとなっている高分子量医薬は、その一側面において比較的広くて浅いタンパク質間相互作用(PPI, protein-protein interaction)の制御に有効とされている(図1)。抗体などの医薬品は、体内動態に優れた性質を有する一方で、高価であるため医療経済にとっては負担である。そこで、高分子量医薬の特徴である標的分子に対する特異性を保持できる分子として挙げられるのが、中分子ペプチドである。最近のペプチド合成化学の発展は、比較的安価に均質なペプチド化合物の供給を可能としている。よって、図1に示すような、タンパク質AとBとの相互作用を阻害するタンパク質Cの機能を保持する中分子Dを開発する取組みは、創薬研究の裾野を広げるものである。

図1にマイオスタチンの活性制御機構をあてはめると、タンパク質Aがマイオスタチン、アクチビンI型受容体がB、これらの相互作用を阻害するタンパク質Cがプロドメインにあたる。この詳細は次項2.で述べるが、筆者らは、C(プロドメイン)の機能を有する中分子Dへの展開が未開拓であったことから、生来のマイオスタチン不活性化機構に立脚した合成ペプチド阻害剤の獲得に向けた研究に着手した。

## 2. マイオスタチン阻害ペプチドの発見

細胞内で産生されたマイオスタチン前駆体は、他のTGF- $\beta$ スーパーファミリー分子と同様にしてfurin様プロテアーゼが作用することでプロドメインと成熟ドメイン間が切断され、

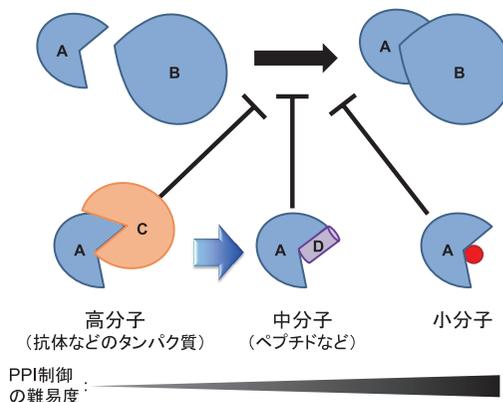


図1 タンパク質間相互作用(PPI, タンパク質AとBの相互作用)の阻害

一般的には、分子サイズが小さくなると親和性が低下し、PPI制御の難易度が高くなるとされている。高分子Cの機能をもつ中分子Dや小分子を創出する種々の取組みがなされている。

成熟ドメインはジスルフィド結合形成により二量体化することで成熟体(一般に、マイオスタチンはこれを指す)となる<sup>16)</sup>。生成したマイオスタチン(成熟体)は、プロドメイン2分子と相互作用することで不活性複合体として細胞外マトリックス上に保持される機構が知られている<sup>17)</sup>。プロドメインのN末端領域は、マイオスタチンのアクチビンI型受容体結合部位に相互作用しており(図2)、この領域を含む74残基のヒト配列由来ペプチドフラグメントがグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質としてマイオスタチン阻害能を有することがJiangらにより報告されていた<sup>18)</sup>。しかしながら、この2004年の報告以来、より短いペプチドフラグメントによるマイオスタチン阻害例は皆無であった。マイオスタチンの二量体における溝になっている部分がアクチビンI型受容体の細胞外ドメインが結合する部位であり<sup>19)</sup>、そのPPIを阻害するためにはある一定以上の嵩高さ(分子サイズ)をもつことが必要なのではないかと推察される。一方で、TGF- $\beta$ 1も同様の不活性化複合体を形成しており、プロドメインのN末端 $\alpha$ -ヘリックス領域に存在するIleおよび

ヒトマイオスタチン前駆体

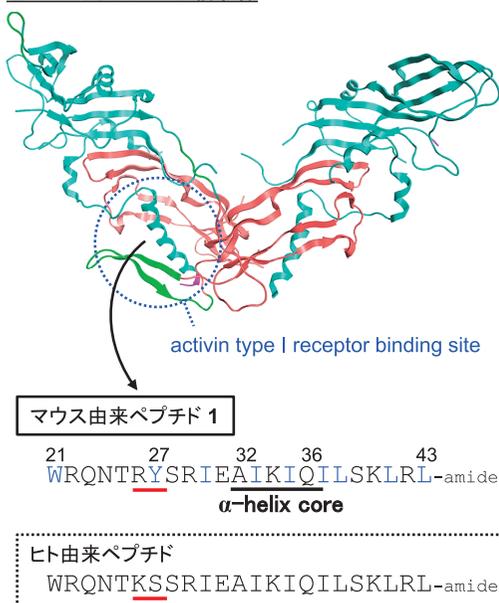


図2 ヒトマイオスタチン前駆体の結晶構造 (PDB code: 5NTU) のリボン表示 (MOE ソフトウェアを用いて作製, cyan: プロドメイン, rose: 成熟ドメイン, green and purple: 二量体のうち片方の鎖のみ構造が解かれている領域) アクチビン I 型受容体結合部位に相互作用するプロドメイン N 末端 α-ヘリックス領域のマウス配列からマイオスタチン阻害ペプチド 1 を同定 (赤下線: ヒト配列と異なるアミノ酸残基, 黒下線: α-ヘリックス構造形成時のコア領域とされた部位, 青字: マイオスタチン阻害能の発揮に重要なアミノ酸残基, 配列上部の数字: マウスマイオスタチン前駆体プロドメインの残基番号)。

Leu 残基が重要な役割を果たしていることが明らかとされていた<sup>20, 21)</sup>。これらのアミノ酸残基はマイオスタチンプロドメインにおいても保存されており, 相互作用のコアであると考えられるため, 筆者らは当該領域に着眼した。マウスマイオスタチン前駆体プロドメインに由来する各種区分ペプチドを合成することで, 最終的に最小構造として 21-43 位に由来する 23 残基ペプチド 1 の同定に成功した (図 2)<sup>22)</sup>。HEK293 細胞を用いたマイオスタチン応答性ルシフェラーゼレポーターアッセイにおけるペプチド 1 の IC<sub>50</sub> 値は 3.56 μM であったが (図 4), 興味深いことに, ヒト由来配列では顕著な阻害は得

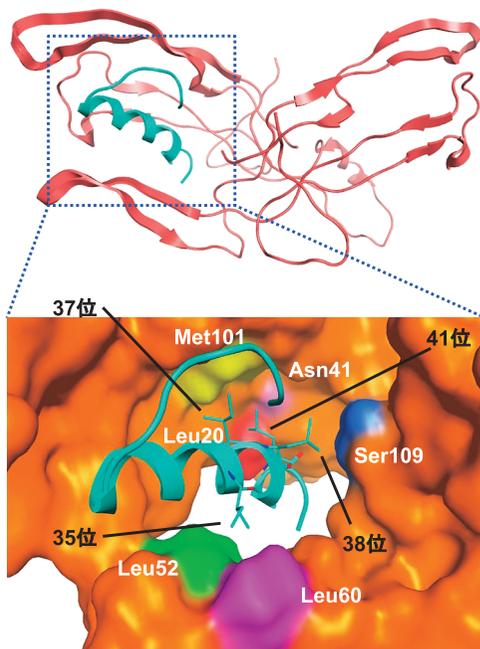


図3 MOE ソフトウェアによるドッキングシミュレーションで得られたペプチド 1-マイオスタチン結合モデル (cyan: ペプチド 1, rose: 成熟ドメイン) と相互作用の詳細 (orange: マイオスタチン表面, red: Leu20, pink: Asn41, green: Leu52, purple: Leu60, yellow: Met101, blue: Ser109, 黒字: ペプチド 1 の側鎖を表示したアミノ酸残基番号)

られなかった<sup>22, 23)</sup>。ゆえに, マウス配列を探索したことが合成ペプチドによるマイオスタチン阻害の道を切り拓いたと言える。

### 3. ペプチド 1 の分子機能解明

ペプチド 1 の分子機能を明らかにすることは, 阻害能の強化や新しい構造プラットフォームへの展開を図る上で必要不可欠である。

まず, ペプチド 1 の二次構造特性を円二色性 (CD) スペクトル測定により解析したところ, α-ヘリックス構造形成能を有していることがわかった<sup>22)</sup>。次に, 1 残基ずつ Ala に置換した誘導体に関して, 阻害能の保持あるいは減弱を評価すること (Ala スキャン) で構成アミノ酸

	IC <sub>50</sub> (μM)	structural content (%)			
		α-helix	β-sheet	turn	random coil
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">マイオスタチン阻害ペプチド誘導体</div> ペプチド 1    21            28            32            38            43 WRQNTYRSRIEAIKIQILSKLRL-amide	3.56	45	5	14	36
ペプチド 2 (不活性体)            SRIEAIKIQILSKLRL-amide	> 30	31	18	10	41
ペプチド 3    XRQNTYRSRIEWIKIQILSKLRL-amide (X = 2-naphthoxyacetyl group)	0.32	8	58	0	34
MIPE-1686                    WYIRwIKXQIWSKXRL-amide (w = D-Trp, X = cyclohexylglycine)	0.13	0	76	0	24

図 4 ペプチド 1 を基にした構造活性相関研究により創製したペプチド誘導体のアミノ酸配列と各ペプチドのマイオスタチン阻害能 (IC<sub>50</sub> 値) および二次構造特性 (structural content は Reed のリファレンスペクトルを用いて解析)

の活性発現への寄与の程度を明らかにした。その結果、N 末端 (21 位) の Trp, 27 位の Tyr および C 末端領域にある 7 つの分岐鎖アミノ酸 (Ile, Leu) の 9 残基がペプチド 1 の効果的なマイオスタチン阻害に重要であることが示された (図 2)<sup>24)</sup>。マイオスタチンのアクチビン I 型受容体結合部位は疎水性領域が主であることから妥当な結果である。以上の結果を踏まえ、ペプチド配列中で α-ヘリックス構造形成に関わる中心的領域を明らかにするために、阻害能の発揮に重要ではないとされた部位 (24, 28, 32, 36, 40 位) に α-ヘリックスブレイカーである Pro を導入し、マイオスタチン阻害能と二次構造に与える影響を評価した。32 と 36 位に Pro を導入した誘導体において特に顕著な阻害能の減弱と α-ヘリックス構造形成能の低下の両方が認められたため、ペプチド 1 が形成する α-ヘリックス構造は 32-36 位がコア領域であることが示唆された (図 2)<sup>24)</sup>。また、35 位 Ile は、TGF-β1 プロドメイン配列では Gly に相当するため当該部位の側鎖の重要性に関して未解析であったが、以上の検討によりペプチド 1 の α-ヘリックス構造における 2 つ目の疎水面形成に寄与している可能性が浮上してきた<sup>24)</sup>。

さて、ヒト配列ではなくマウス配列の探索が、なぜ阻害ペプチド獲得に功を奏したか。27 位 Tyr の存在がその確からしい答えである。ヒト

とマウスの配列の違いは、26 および 27 位の 2 箇所のみであり (図 2)、上述の Ala スキャンで 27 位 Tyr が重要残基として同定されたことから容易に推定される。更に Tyr 残基の意義について検討するため、各種天然アミノ酸 (Phe, Trp, His, Gln, Arg, Glu) および D 体の Tyr (D-Tyr) へ置換した誘導体を合成し、阻害能を評価した。その結果、Phe および Trp, D-Tyr への置換が可能であることが明らかとなった<sup>24)</sup>。尚、これらのアミノ酸置換による二次構造への影響はなかった。即ち、27 位に L 体もしくは D 体の中性芳香族アミノ酸が存在することが、ペプチド 1 の阻害能の発揮に関与していると考えられた。多くの動物種で本部位はヒトと同じ Ser 残基である一方、げっ歯類のみが Tyr であり、わずかなアミノ酸配列の違いにより生体高分子の中分子ペプチドサイズへの小型化の成否が分かれる好例と言える。

ペプチド 1 の阻害能という点においては、N 末端 Trp (21 位) は大きな寄与をしている。28-43 位の 16 残基ペプチド (2) 中には、重要残基とされる 7 つの分岐鎖アミノ酸が全て含まれているにも関わらず、また α-ヘリックス構造を形成する性質を有しているにも関わらず、阻害能は皆無であった (図 4)<sup>22, 25)</sup>。また、21 位 Trp の欠損体では、顕著な阻害能の減弱とともに、表面プラズモン共鳴法を用いたマイオスタ

チンとの親和性解析において少なくとも3倍の $K_D$ 値増大が認められた(ペプチド**1**の $K_D$ 値は30 nM)<sup>22)</sup>。したがって、上述の27位 Tyr と共に、N末端 Trp を含む23残基ペプチドとしてはじめて3.56  $\mu$ Mの $IC_{50}$ 値でのマイオスタチン阻害が得られるものであり、更なる小型化はこの時点では難しいと思われた。

---

#### 4. マイオスタチン結合モデルの提唱

---

2018年にCottonらにより、ヒトマイオスタチン前駆体が形成する不活性化体のX線結晶構造解析が報告された(Protein Data Bank code: 5NTU)<sup>17)</sup>。TGF- $\beta$ 1と同様に、ペプチド**1**の配列を含むプロドメインN末端領域がアクチビンI型受容体結合部位と相互作用していることが示されたが(図2)、これはあくまでもタンパク質としての構造である。一般に直鎖ペプチドはゆらぎが大きく、酵素ポケットのような限られた空間へはまり込まない限り、固定された構造としての観察は容易ではない。また、緩衝液中でのとりうる構造とタンパク質結合時の構造が異なる可能性は大いにある。マイオスタチンと合成化合物との複合体の構造解析は未達成である状況下、筆者らはMolecular Operating Environment (MOE) ソフトウェアを用い、上述3.で得られたペプチド**1**の分子機能に関する知見に基づいたドッキングシミュレーションを実施した<sup>26)</sup>。

構造テンプレートには5NTU (PDB code) を用い、各種拘束条件を設定したペプチドとマイオスタチンとのドッキングの確からしさは、Ala スキャンで同定した重要残基側鎖のエネルギー的に有利なファンデルワールスもしくはアレン相互作用の有無により評価した。最終的に、ペプチド**1**のアミノ酸配列において30-41位の主鎖のみを $\alpha$ -ヘリックス構造に拘束設定し、

エネルギー最小化計算における上位10個の安定構造をinduced fitによるドッキングシミュレーションに付すことで、マイオスタチンのアクチビンI型受容体結合部位にペプチドが相互作用した4つのモデルを得た。中でも図3に示すモデルにおいては、Ala スキャンで重要残基とした9アミノ酸残基すべてでエネルギー的に有利なファンデルワールス相互作用が観察された。また、4つのモデルにおいてペプチド**1**との相互作用に直接的に関与する共通のマイオスタチン残基が6つ挙げられた。即ち、Leu20, Asn41, Leu52, Leu60, Met101, Ser109(いずれも成熟ドメインにおける残基番号)は、阻害分子の主要な作用標的である可能性が示唆された。これらの残基は、図3のモデルにおいて、35, 37, 38, 41位と相互作用しているが、他の3つのモデルにおいては、Met101はペプチドN末端のTrpとの相互作用がみられる。一方で、図3のモデルにおいて当該TrpはCys108と、27位 Tyr はAsn88との相互作用があり、主要標的残基周辺との補完的な相互作用を如何に形成できるかが、強力な阻害剤の創製への鍵となることが得られたデータから読み取れる。ゆえに、今後の新たな阻害剤デザインにおいて、本検討で得られた知見は有効に活用できるものと考えている。

---

#### 5. 阻害能の強化と小型化

---

創薬的側面を考慮すると、ペプチド**1**の阻害能強化と酵素に対する安定性の確保は推し進めるべき課題である。また、分子サイズの小型化は、抗原性の低減や製造コストの削減、更にはプロテアーゼによる分解を受ける部位を減らして安定性を高めることが期待できるものである<sup>27)</sup>。

ペプチド**1**を基盤に、上述3.のAla スキャンで重要とされた9つのアミノ酸残基の誘導体

化を軸に、阻害能強化のための構造活性相関研究を進めた。まず、N末端 Trp に関して 36 種類の誘導体合成を行った中でも、2-ナフチルオキシ酢酸への変換が阻害能を最も向上させた<sup>23)</sup>。次に、各分岐鎖アミノ酸の保存的置換を検討し、38位 Leu を Ile に置換することで阻害能向上が得られた<sup>28)</sup>。また Ala スキャンで未検討の 32位 Ala に関しては、興味深いことに Trp や Val, Glu のような各種天然アミノ酸の導入により強力な阻害が認められた。これらの中から、ケミカルスペースを埋め、且つより大きな疎水面を提供できる Trp を選択し、38位に Ile を有し N 末端が 2-ナフチルオキシアセチル化された 22 残基ペプチド **3** を新たに創製した(図 4)。ペプチド **3** は、ペプチド **1** よりも約 10 倍強力な 0.32  $\mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  値でマイオスタチンを阻害した<sup>28)</sup>。

このような阻害能の強化に付随して、二次構造特性について新たな知見を得た。上述 **3** の検討でペプチド **1** の効果的なマイオスタチン阻害において  $\alpha$ -ヘリックス構造形成能の重要性を示していたが、ペプチド **3** は  $\beta$ -シート構造を形成する傾向を示した(図 4)。別途、 $\alpha$ -ヘリックス構造を強化する環状化などの誘導体化をいくつか施したが、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成する性質を示さず、 $\beta$ -シート性と阻害能が保持される結果であった<sup>29)</sup>。したがって、ペプチド **1** と **3** は異なる相互作用様式にてマイオスタチンを阻害していると考えられた。

ここで、ペプチドの小型化の可能性について再検討することにした。N末端 Trp の 2-ナフチルオキシ酢酸への変換のみでは  $\alpha$ -ヘリックス構造形成能に変化が認められなかったことから<sup>23)</sup>、ペプチド **3** の  $\beta$ -シート構造形成能は 32 および 38 位への Trp, Ile 導入に由来するものであり、この誘導体化を不活性な 28-43 位の 16 残基ペプチド (**2**) に適用することで二次構造特性が変化し、阻害能を引き出せるのではな

いかと考えた。この仮定のもと合成したペプチドは、10  $\mu\text{M}$  において顕著なマイオスタチン阻害能を示し、16 残基からなる阻害ペプチド創製の皮切りとなる結果を得た<sup>25)</sup>。また各種誘導体合成の過程で、16 残基ペプチドの N 末端 2 残基 (28, 29 位) の Ser-Arg を Trp-Tyr に置換することでも、阻害剤として機能しうることを見出した<sup>25)</sup>。これらのブレイクスルーとなるデータを礎に、最終的に 0.13  $\mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  値を有するマイオスタチン阻害ペプチド MIPE-1686 の創出に至った(図 4)<sup>25)</sup>。以上のマイオスタチン阻害能をもつ 16 残基ペプチドはいずれも  $\beta$ -シート構造を形成する性質を有しており、特に MIPE-1686 はその性質が強いことが明らかとなった。

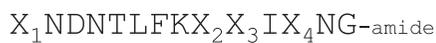
MIPE-1686 は、3 残基の非天然アミノ酸を含むものの、N末端が無保護の直鎖ペプチドであるため、酵素分解に対する耐性が課題と思われた。ところが予想に反して、アミノペプチダーゼ N, キモトリプシン C, トリプシン 3 に対する高い分解耐性を示した<sup>30)</sup>。MIPE-1686 獲得の過程で合成した誘導体のプロテアーゼ耐性と二次構造との関係性を検討すると、 $\beta$ -シート性が高いとプロテアーゼによる分解を受けにくくなる傾向が見られた。本検討の成果は、酵素切断部位から離れたアミノ酸残基の置換によっても、L 体を基調としたペプチドの二次構造を変化させることで酵素に対する安定性を制御できる方法論として、生体分子に由来する中分子ペプチド創薬において意味をもつものと言える。

最後になるが、生体における持続的な効果を期待できる MIPE-1686 を、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスの筋肉内に投与した。Day 0 および 14 に 2 回投与後、day 42 において有意な筋重量の増加と後肢握力の強化が認められる結果を得た<sup>25)</sup>。今後、MIPE-1686 は筋萎縮病態を克服するための治療薬シーズとしての研究進展が大いに期待される。

## 6. 更なる小型化は可能か

前項までにマイオスタチン阻害ペプチドを16残基まで分子サイズを小さくできたことを述べてきた。果たして、現在までに得られている阻害能を保持あるいは強化しながらの更なる小型化は今後どこまで可能であるのか。

筆者らは、マイオスタチンのアクチビンI型受容体結合部位に相互作用するプロドメインの領域に着目して合成ペプチド阻害剤**1**を獲得したことに倣い、フォリスタチンのN末端ドメインの $\alpha$ -ヘリックス領域を含む14残基の阻害ペプチドDF-3の同定に別途成功している(図5)<sup>31</sup>。DF-3は、野生型C57BL/6Jマウスの前脛骨筋への単回投与後28日目において有意な筋重量増加効果を示した<sup>31</sup>。ペプチド**1**とはアミノ酸配列が全く異なる新たなプラットフォームとしてDF-3を用いた構造活性相関研究を上述と同様にルシフェラーゼレポーターアッセイ系にて実施した。その結果、DF-3よりも約2倍強力なマイオスタチン阻害能を有するDF-100(14残基、図5)の創製に至った<sup>32</sup>。ただし、DF-3とDF-100のIC<sub>50</sub>値はそれぞれ



compd.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
DF-3	Val	Trp	Met	Phe
DF-100	Phg	Phe	Hph	Phe(4-F)

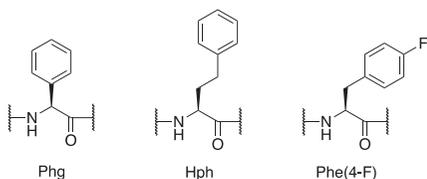


図5 フォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチド(14残基)のアミノ酸配列と非天然アミノ酸Phg(フェニルグリシン), Hph(ホモフェニルアラニン), Phe(4-F)(4-フルオロフェニルアラニン)の構造

9.5  $\mu$ M, 4.0  $\mu$ Mであり、MIPE-1686に比べると10倍以上弱い阻害能であった。

以上のように、これまでにマイオスタチン阻害ペプチドに関して網羅的な誘導体化を進めてきた中で、筆者らの未発表のデータを含めても、15残基ペプチド(分子量 $\approx$ 2000)が1  $\mu$ M以下のIC<sub>50</sub>値となる最短である。したがって、MIPE-1686と同程度あるいはそれよりも強力な阻害能を保持した14残基以下のより小さなペプチドを新たに獲得するには、 $\beta$ -シート性が高い阻害ペプチドがどのような相互作用様式にてマイオスタチンを阻害しているかを明らかにすることが必要なステップとして挙げられる。これとペプチド**1**の相互作用様式との比較は、阻害能向上の分子メカニズムの理解につながる。X線結晶構造解析のようなコンピュータモデリングに頼らない方法での解明が望ましいことは言うまでもないが、阻害に必要な構造的要件が絞られることにより更なる小型化、即ち中分子ペプチドから非ペプチド、あるいは小分子化合物への道が拓けることが期待される。

### 【謝辞】

本稿の研究は、日本学術振興会科学研究費若手研究(B)(課題番号:17K15484)、上原記念生命科学財団研究奨励金(平成29年度)、第21回リバネス研究費Pall FortéBIO賞、東京薬科大学知的財産創成研究助成金(平成24年度)の助成を受けて行った。この場を借りて厚く御礼申し上げます。主たる研究は、東京薬科大学東京薬科大学薬学部薬品化学教室にて遂行されたものであり、林良雄教授、谷口敦彦准教授、田口晃弘講師、Cédric Rentier博士研究員(当時)および学生諸氏のご助力に感謝申し上げます。動物を用いた研究の遂行にあたり、東京薬科大学薬学部薬物送達学教室の根岸洋一教授には $mdx$ マウスを用いた検討において、また藤田医科大学総合医科学研究所難病治療学研究部門の土田邦博教授および常陸圭介助教にはC57BL/6Jマウスを用いた検討において多大なるご尽力を賜りました。この場を借りて深謝申し上げます。

## 【利益相反】

本研究の内容に関連し、著者の開示すべき利益相反はありません。

## 【引用文献】

- 1) Alexandra C. McPherron, Ann M. Lawler, Se-Jin Lee. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*. **1997**, 387(6628), 83–90.
- 2) Teresa A. Zimmers, Monique V. Davies, Leonidas G. Koniaris, Paul Haynes, Aurora F. Esquela, Kathy N. Tomkinson, Alexandra C. McPherron, Neil M. Wolfman, Se-Jin Lee. Induction of cachexia in mice by systemically administrated myostatin. *Science*. **2002**, 296(5572), 1486–1488.
- 3) Sasha Bogdanovich, Thomas O. B. Krag, Elisabeth R. Barton, Linda D. Morris, Lisa-Anne Whittemore, Rexford S. Ahima, Tejvir S. Khurana. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. **2002**, 420(6914), 418–421.
- 4) Michael St. Andre, Mark Johnson, Prashant N. Bansal, Jeremy Wellen, Andrew Robertson, Alan Opsahl, Peter M. Burch, Peter Bialek, Carl Morris, Jane Owens. A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monkeys. *Skelet. Muscle*. **2017**, 7(1), 25.
- 5) Clemens Becker, Stephen R. Lord, Stephanie A. Studenski, Stuart J. Warden, Roger A. Fielding, Christopher P. Recknor, Marc C. Hochberg, Serge L. Ferrari, Hubert Blain, Ellen F Binder, Yves Rolland, Serge Poiraudreau, Charles T. Benson, Stephen L. Myers, Leijun Hu, Qasim I. Ahmad, Kelli R. Pacuch, Elisa V. Gomez, Olivier Benichou, STEADY Group. Myostatin antibody (LY2495655) in older weak fallers: a proof-of-concept, randomised, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. **2015**, 3(12), 948–957.
- 6) Xiaolan Zhou, Jin Lin Wang, John Lu, Yanping Song, Keith S. Kwak, Qingsheng Jiao, Robert Rosenfeld, Qing Chen, Thomas Boone, W. Scott Simonet, David L. Lacey, Alfred L. Goldberg, H. Q. Han. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*. **2010**, 142(4), 531–543.
- 7) Kenneth M. Attie, Niels G. Borgstein, Yijun Yang, Carolyn H. Condon, Dawn M. Wilson, Amelia E. Pearsall, Ravi Kumar, Debbie A. Willins, Jas S. Seehra, Matthew L. Sherman. A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve*. **2013**, 47(3), 416–423.
- 8) Craig Campbell, Hugh J. McMillan, Jean K. Mah, Mark Tarnopolsky, Kathryn Selby, Ty McClure, Dawn M. Wilson, Matthew L. Sherman, Diana Escobar, Kenneth M. Attie. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve*. **2017**, 55(4), 458–464.
- 9) Virginie Mariot, Romain Joubert, Christophe Hourdé, Léonard Féasson, Michael Hanna, Francesco Muntoni, Thierry Maisonnobe, Laurent Servais, Caroline Bogni, Rozen Le Panse, Olivier Benveniste, Tanya Stojkovic, Pedro M. Machado, Thomas Voit, Ana Buj-Bello, Julie Dumonceaux. Downregulation of myostatin pathway in neuromuscular diseases may explain challenges of anti-myostatin therapeutic approaches. *Nat. Commun*. **2017**, 8(1), 1859.
- 10) Se-Jin Lee, Adam Lehar, Yewei Liu, Chi Hai Ly, Quynh-Mai Pham, Michael Michaud, Renata Rydzik, Daniel W. Youngstrom, Michael M. Shen, Vesa Kaartinen, Emily L. Germain-Lee, Thomas A. Rando. Functional redundancy of type I and type II receptors in the regulation of skeletal muscle growth by myostatin and activin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, 117(49), 30907–30917.
- 11) Esther Latres, Jason Mastaitis, Wen Fury, Lawrence Miloscio, Jesus Trejos, Jeffrey Pangilinan, Haruka Okamoto, Katie Cavino, Erqian Na, Angelos Papatheodorou, Tobias Willer, Yu Bai, Jee Hae Kim, Ashique Rafique, Stephen Jaspers, Trevor Stitt, Andrew J. Murphy, George D. Yancopoulos, Jesper Gromada. Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8. *Nat. Commun*. **2017**, 8(1), 15153.
- 12) Andrea Iskenderian, Nan Liu, Qingwei Deng, Yan Huang, Chuan Shen, Kathleen Palmieri, Robert Crooker, Dianna Lundberg, Niksa Kastrapeli, Brian Pescatore, Alla Romashko, John Dumas, Robert Comeau, Angela Norton, Jing Pan, Haojing Rong, Katayoun Derakhchan, David E. Ehmann. Myostatin and activin blockade by engineered follistatin results in hypertrophy and improves dystrophic pathology in

- mdx mouse more than myostatin blockade alone. *Skelet. Muscle*. **2018**, 8(1), 34.
- 13) Takayuki Ozawa, Masato Morikawa, Yasuyuki Morishita, Kazuki Ogikubo, Fumiko Itoh, Daizo Koinuma, Per-Åke Nygren, Kohei Miyazono. Systemic administration of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein increases muscle mass in mice. *iScience*. **2021**, 24(5), 102488.
  - 14) Uwe Michel, Anthony Albiston, Jock K Findlay. Rat follistatin: Gonadal and extragonadal expression and evidence for alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 173(1), 401–407.
  - 15) Uwe Michel, Paul Farnworth, Jock K Findlay. Follistatins: More than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1993**, 91(1–2), 1–11.
  - 16) Se-Jin Lee and Alexandra C. McPherron. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98(16), 9306–9311.
  - 17) Thomas R. Cotton, Gerhard Fischer, Xuelu Wang, Jason C. McCoy, Magdalena Czepnik, Thomas B. Thompson, Marko Hyvönen. Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *EMBO J.* **2018**, 37(3), 367–383.
  - 18) Man-Shiow Jiang, Li-fang Liang, Shusheng Wang, Tamara Ratovitski, James Holmstrom, Christopher Barker, Ronald Stotish. Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 315(3), 525–531.
  - 19) Andrew P. Hinck. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors—insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett.* **2012**, 586(14), 1860–1870.
  - 20) Minlong Shi, Jianghai Zhu, Rui Wang, Xing Chen, Lizhi Mi, Thomas Walz, Timothy A. Springer. Latent TGF- $\beta$  structure and activation. *Nature*. **2011**, 474(7351), 343–349.
  - 21) Kelly L. Walton, Yogeshwar Makanji, Justin Chen, Matthew C. Wilce, Karen L. Chan, David M. Robertson, Craig A. Harrison. Two distinct regions of latency-associated peptide coordinate stability of the latent transforming growth factor-beta1 complex. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285(22), 17029–17037.
  - 22) Kentaro Takayama, Yuri Noguchi, Shin Aoki, Shota Takayama, Momoko Yoshida, Tomo Asari, Fumika Yakushiji, Shin-ichiro Nishimatsu, Yutaka Ohsawa, Fumiko Itoh, Yoichi Negishi, Yoshihide Sunada, Yoshio Hayashi. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J. Med. Chem.* **2015**, 58(3), 1544–1549.
  - 23) Kentaro Takayama, Akari Nakamura, Cédric Rentier, Yusaku Mino, Tomo Asari, Yusuke Saga, Akihiro Taguchi, Fumika Yakushiji, Yoshio Hayashi. Effect of N-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides. *ChemMedChem*. **2016**, 11(8), 845–849.
  - 24) Tomo Asari, Kentaro Takayama, Akari Nakamura, Takahiro Shimada, Akihiro Taguchi, Yoshio Hayashi. Structural basis for the effective myostatin inhibition of the mouse myostatin prodomain-derived minimum peptide. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8(1), 113–117.
  - 25) Kentaro Takayama, Tomo Asari, Mariko Saitoh, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Yoshimi Roppongi, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi. Chain-shortened myostatin inhibitory peptides improve grip strength in mice. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, 10(6), 985–990.
  - 26) Tomo Asari, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Kentaro Takayama. Proposal for the binding mode of the 23-mer inhibitory peptide to myostatin. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 40, 116181.
  - 27) André D. Siemensma, Wicher J. Weijer, Henk J. Bak. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, 4(1), 16–21.
  - 28) Kentaro Takayama, Cédric Rentier, Tomo Asari, Akari Nakamura, Yusuke Saga, Takahiro Shimada, Kei Nirasawa, Eri Sasaki, Kyohei Muguruma, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoichi Negishi, Yoshio Hayashi. Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, 8(7), 751–756.
  - 29) Cédric Rentier, Kentaro Takayama, Mariko Saitoh, Akari Nakamura, Hiroaki Ikeyama, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi. Design and synthesis of potent myostatin inhibitory cyclic peptides. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27(7), 1437–1443.
  - 30) Kentaro Takayama, Miki Odagiri, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Enzymatic stability of myostatin inhibitory 16-mer peptides. *Chem. Pharm. Bull.* **2020**, 68(6), 512–515.

- 31) Mariko Saitoh, Kentaro Takayama, Keisuke Hitachi, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Kunihiro Tsuchida, Yoshio Hayashi. Discovery of a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30(3), 126892.
- 32) Mariko Saitoh, Kentaro Takayama, Yoshimi Roppongi, Takahiro Shimada, Akihiro Taguchi, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi. Strategic structure-activity relationship study on a follistatin-derived myostatin inhibitory peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 46, 128163.

## The potential for structural minimization of myostatin inhibitory molecules

Kentaro Takayama

Department of Environmental Biochemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Myostatin, a negative regulatory factor of skeletal muscle growth, is a promising target for treating muscle atrophic disorders such as muscle dystrophy. The prodomain protein derived from the myostatin precursor acts as an endogenous myostatin-inhibitory molecule. The author focused on the N-terminal region of prodomain, which interacts with the activin type I receptor binding site of myostatin, to discover a mid-sized peptide inhibitor. In 2015, the mouse myostatin prodomain-derived 23-mer peptide **1** was identified as a minimum structure bearing effective myostatin inhibition with the  $IC_{50}$  value of 3.56  $\mu$ M. Based on the peptide **1**, a series of structure-activity relationship studies were carried out to clarify the molecular function and obtain a more potent inhibitory peptide. The Ala scanning and secondary structure analysis afforded the findings to elucidate the structural basis for the effective inhibition of peptide **1**. This effort supported the docking simulation of peptide **1** with myostatin; consequently, the important residues related to the inhibitory peptide-binding, namely the promising target residues, were proposed. On the other hand, MIPE-1686, a chain-shortened 16-mer peptide, with the  $IC_{50}$  value of 0.13  $\mu$ M was successfully developed as a potent inhibitor. These results would accelerate the new study to design a smaller and more potent inhibitor in the future.

**Keywords:** structure-activity relationship, protein-protein interaction, molecular function, peptide, myostatin