

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12739

研究課題名(和文)人工天然物の創製

研究課題名(英文)Development of artificial natural products

研究代表者

後藤 佑樹 (Goto, Yuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：70570604

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):ペプチド性天然物には、修飾型的主鎖骨格が多く見受けられる。これら特徴的な主鎖骨格は、ペプチド性天然物が強い生理活性を示す上で重要な構造モチーフであり、主鎖修飾型のペプチドは天然物としてだけでなく、人工の生物活性分子候補としても利用価値が高いと言える。本研究では、様々な人工アゾリンペプチドの合成が可能で、試験管内人工生合成系(FIT-PatD)を確立した。さらに、化学的な修飾反応を組み合わせることで、より多彩な主鎖骨格を有するペプチドの生産も実現した。

研究成果の概要(英文):Peptidic natural products often consist of not only simple amide bonds but also modified backbones. Since such unique backbones are important structural motifs that contribute to diverse bioactivities, peptides with modified backbones can also be attractive candidates for artificial bioactive peptides. This research program devised an in vitro biosynthesis system referred to as FIT-PatD system by the integration of an engineered cell-free translation system with a posttranslational cyclodehydratase, enabling "one-pot" synthesis of a wide variety of azoline-containing peptide derivatives expressed from synthetic DNA templates. Moreover, we have demonstrated in vitro biosynthesis of peptides with various backbone structures by combination of the FIT-PatD system and chemical modifications. These results offer the potentials for the production of a wide collection of backbone-modified peptides and may facilitate the discovery of "pseudo-natural" bioactive peptides.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ペプチド 主鎖修飾ペプチド 人工生合成系 翻訳後修飾 化学修飾

1. 研究開始当初の背景

近年の化学合成法や試験管内翻訳合成系の発達により、簡便に望みの配列のペプチドを合成することが可能になってきている。しかしながら、強い生物活性を誇る天然物には、主鎖がアミド結合だけではなく、アゾリン骨格などのヘテロ環を始めとした主鎖骨格修飾を含むペプチドが多く存在しており(図1)、これら及びその誘導体の合成には技術的な困難を伴うことが依然として多い。もしこういった生物活性分子として高いポテンシャルを有する化合物群を自在にかつ簡便に合成できれば、天然物を模した人工生物活性分子の創製の道が拓ける。

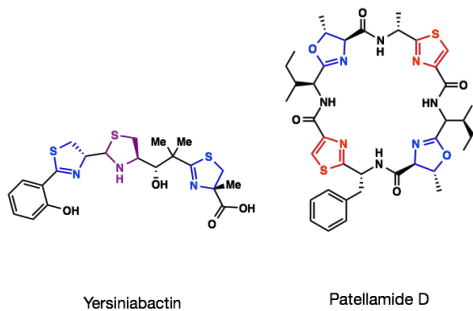


図1 天然物に見られる主鎖骨格修飾を含むペプチドの例

2. 研究の目的

本研究課題では、人工天然物の創製に資する試験管内人工合成系を開発することを目指した。具体的には、強い生物活性の発揮に重要と期待される複数の主鎖修飾型ペプチドを簡便に生産できる試験管内人工合成系をそれぞれ確立することが目標である。

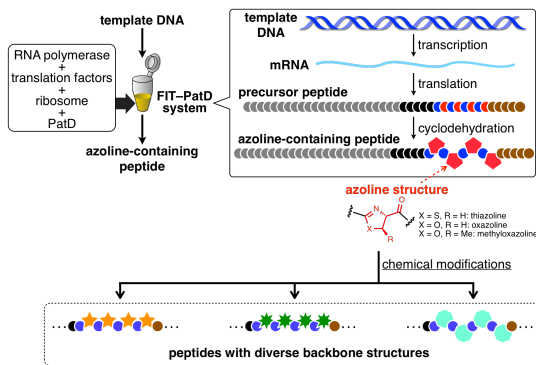


図2 PatDによる翻訳後修飾と化学的酸化反応を組み合わせたチアゾール環含有ペプチドの試験管内人工合成

3. 研究の方法

本研究では、後藤らがこれまでに開発してきた改変翻訳系・高い基質許容性を持つペプチド修飾酵素(PatD)・水中で進行する有機化学的骨格変換反応、の三者を組み合わせることで、試験管内人工合成系を構築した。これにより、三段階の骨格形成/骨格変換ステップ[①遺伝暗号リプログラミング法を用いた

非タンパク質性アミノ酸を含むペプチド鎖の形成・②ペプチド中のアミド結合を脱水ヘテロ環化する汎用修飾酵素(PatD酵素)による骨格変換・③水中で進行する有機化学反応による非酵素的な骨格変換]を経て、目的の天然物様主鎖修飾ペプチドがDNAを鋳型として生産される(図2)。この生合成系と有機合成の長所を融合する戦略により、多彩な主鎖修飾ペプチドの合成を行った。

4. 研究成果

本課題の研究成果の一つとして、主鎖ヘテロ環骨格の一つであるチアゾール環を有するペプチドの試験管内人工合成系を確立した(図3)。ペプチド主鎖骨格中のチアゾール構造は生物活性を示す天然物に広く見られる構造であり、チアゾール含有ペプチドを簡便に合成する技術の開発は、優れた新規生物活性ペプチド創出への応用が期待される。モデル実験において、脱水複素環化酵素 PatD により連続するチアゾリン構造がペプチドに導入される際、副産物としてチアゾール-チアゾリン構造が形成することを見出し、この副反応を積極的に利用することでチアゾール含有ペプチドの合成を行うことを着想した。実際に脱水複素環化酵素 PatD による酵素修飾の後に、化学的に酸化反応を行うことで、チアゾール-チアゾリン構造が得られることが分かった。加えて、遺伝暗号リプログラミング法を用いて位置特異的な重水素ラベル化を行うことで、酸化反応によるチアゾール構造の形成が位置特異的に進行することが明らかとなった。本研究により確立された酸化反応は種々のペプチド配列に適用可能であることも示され、汎用的なチアゾール含有ペプチドの試験管内人工合成法が確立された。また、人工アミノ酸であるβ-ハロトレオニン(β-halo-threonine)を遺伝暗号のリプログラミング法にてペプチド鎖に導入後、PatDによるオキサゾリン化・化学的な脱ハロゲン化水素と異性化反応を経ることで、オキサゾール含有ペプチドを合成できる試験管内人工合成法も報告している。

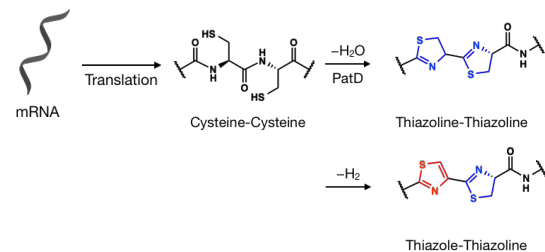


図3 PatDによる翻訳後修飾と化学的酸化反応を組み合わせたチアゾール環含有ペプチドの試験管内人工合成

さらに、主鎖骨格にチアゾリジン構造及び還元型アミド結合(Ψ[CH₂NH]結合)をもつペプチドの試験管内人工合成系も開発した(図4)。チアゾリジン構造は生物活性を示すペプチド性天然物に見られる構造であるが、

様々な基質を許容し、任意の配列に対してチアゾリジン構造を導入できるような翻訳後修飾酵素はこれまでに報告されていない。そこで、PatD 酵素反応によるチアゾリジン環構築と、化学的な還元反応を組み合わせたアプローチをとることでチアゾリジン含有ペプチドの試験管内合成が可能になるのではないかと着想した。モデル実験において、脱水複素環化酵素 PatD によりチアゾリジン構造をペプチドに導入し、これを化学的に還元することで、目的の還元反応に相当する分子量変化を観測し、チアゾリジン含有ペプチドの合成を確認した。また、当初想定していなかった成果として、特定の反応条件下ではチアゾリジンがさらに還元されて還元型アミド結合が生成することも見出した。新たに見出したこの骨格変換反応では、小分子を用いたモデル実験により詳細に確認することで、チアゾリジン部分に発生したイミンが還元される経路で Ψ [CH₂NH]結合が発生していることを提唱した。この還元反応は種々のペプチド配列に適用可能であり、既知のラジカル的な脱硫反応を組み合わせることでさらに多様なペプチド配列をもつ Ψ [CH₂NH]含有ペプチドを合成できることが示された。

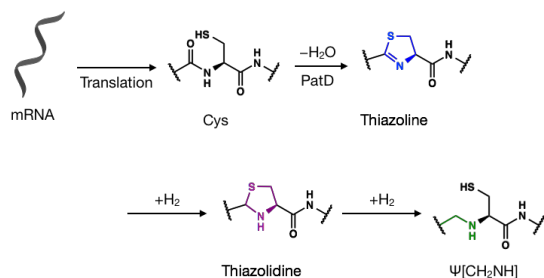


図4 チアゾリジン構造及び還元型アミド結合 (Ψ [CH₂NH]結合)をもつペプチドの試験管内人工合成

以上の通り、本研究では、改変翻訳系と PatD による酵素的な脱水複素環化反応と化学的な反応を組み合わせることにより主鎖骨格修飾ペプチドを試験管内で簡便に合成する技術を確立したものである。これらの手法はペプチド翻訳後修飾反応による構造多様性を拡張したものであり、既存の進化分子工学的手法と組み合わせることで天然物を模した人工生物活性分子の創出に寄与するものと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- (1) Iwane, Y.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. Artificial Division of Codon Boxes for Expansion of the Amino Acid Repertoire of Ribosomal Polypeptide Synthesis, *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1728*, 17. 査読有り

DOI:10.1007/978-1-4939-7574-7_2

- (2) Goto, Y. Elaboration of Pseudo-natural Products Using Artificial In Vitro Biosynthesis Systems, *Yakugaku zasshi* **2018**, *138*, 55. 査読有り
DOI: 10.1248/yakushi.17-00186-3
- (3) Sakurai, Y.; Mizumura, W.; Murata, M.; Hada, T.; Yamamoto, S.; Ito, K.; Iwasaki, K.; Katoh, T.; Goto, Y.; Takagi, A.; Kohara, M.; Suga, H.; Harashima, H. Efficient siRNA Delivery by Lipid Nanoparticles Modified with a Nonstandard Macrocyclic Peptide for EpCAM-Targeting, *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 3290. 査読有り
DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00362
- (4) Ozaki, T.; Yamashita, K.; Goto, Y.; Shimomura, M.; Hayashi, S.; Asamizu, S.; Sugai, Y.; Ikeda, H.; Suga, H.; Onaka, H. Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14207. 査読有り
DOI: 10.1038/ncomms14207
- (5) Kawamura, A.; Munzel, M.; Kojima, T.; Yapp, C.; Bhushan, B.; Goto, Y.; Tumber, A.; Katoh, T.; King, O. N.; Passioura, T.; Walport, L. J.; Hatch, S. B.; Madden, S.; Muller, S.; Brennan, P. E.; Chowdhury, R.; Hopkinson, R. J.; Suga, H.; Schofield, C. J. Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14773. 査読有り
DOI:10.1038/ncomms14773
- (6) Danhart, E. M.; Bakhtina, M.; Cantara, W. A.; Kuzmishin, A. B.; Ma, X.; Sanford, B. L.; Kosutic, M.; Goto, Y.; Suga, H.; Nakanishi, K.; Micura, R.; Foster, M. P.; Musier-Forsyth, K. Conformational and chemical selection by a trans-acting editing domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E6774. 査読有り
DOI:10.1073/pnas.1703925114
- (7) Bacusmo, J. M.; Kuzmishin, A. B.; Cantara, W. A.; Goto, Y.; Suga, H.; Musier-Forsyth, K. Quality control by trans-editing factor prevents global mistranslation of non-protein amino acid alpha-aminobutyrate, *RNA Biol* **2017**, *1*. 査読有り
DOI: 10.1080/15476286.2017.1353846
- (8) Iwane, Y.; Hitomi, A.; Murakami, H.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via

- the artificial division of codon boxes, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 317. 査読有り
DOI: 10.1038/nchem.2446
- (9) Goto, Y.; Suga, H. A posttranslational cyclodehydratase, PatD, tolerates sequence variation in the C-terminal region of the substrate peptides, *Chem. Lett.*, **2016**, *45*, 1247. 査読有り
DOI: 10.1246/cl.160562.
- (10) Goto, Y. In vitro biosynthesis systems for elaboration of novel bioactive peptides, *Pept. Sci.* **2016**, *53*, 1. 査読無し
- (11) Fujino, T.; Goto, Y.; Suga, H.; Murakami, H. Ribosomal synthesis of peptides with multiple beta-amino acids, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1962. 査読有り
DOI: 10.1021/jacs.5b12482
- (12) Liu, Z.; Vargas-Rodriguez, O.; Goto, Y.; Novoa, E. M.; Ribas de Pouplana, L.; Suga, H.; Musier-Forsyth, K. Homologous trans-editing factors with broad tRNA specificity prevent mistranslation caused by serine/threonine misactivation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 6027. 査読有り
DOI:10.1073/pnas.1423664112
- (13) Kato, Y.; Goto, Y.; Suga, H. Laser-induced oxidation of a peptide-embedded thiazoline by an assistance of adjacent thiazoline, *Pept. Sci.* **2015**, *52*, 27. 査読無し
- (14) Iwasaki, K.; Goto, Y.; Katoh, T.; Yamashita, T.; Kaneko, S.; Suga, H. A fluorescent imaging probe based on a macrocyclic scaffold that binds to cellular EpCAM, *J. Mol. Evol.* **2015**, *81*, 210. 査読有り
DOI:10.1007/s00239-015-9710-z
- [学会発表] (計 24 件)
- (1) 後藤佑樹, 人工生合成系を活用した擬天然物の創製戦略, 日本薬学会第 137 年会「薬学における生命指向型化学」, 2017 年 3 月
- (2) Yasuharu Kato, Yuki Goto, Hiroaki Suga, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse modified backbone structures, Directed Biosynthesis V, 2017 年 3 月
- (3) Yuki Goto, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse modified backbones, The 97th CSJ Annual Meeting, Asian International Symposium -Natural Products Chemistry, Chemical Biology/Biofunctional Chemistry and Biotechnology-, 2017 年 3 月
- (4) Yuki Goto, Development of novel bioactive molecules using artificial in vitro biosynthesis systems, The 97th CSJ Annual Meeting CSJ Award for Young Chemists, 2017 年 3 月
- (5) 後藤佑樹, 翻訳反応をつかって薬の候補を創る, 船山研ミニセミナー, 2017 年 2 月
- (6) Yuki Goto, In vitro biosynthesis system for peptides with diverse modified backbones, 2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researchers, 2017 年 3 月
- (7) Yuki Goto, Yasuharu Kato, Hiroaki Suga, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse modified backbone structures, ETHZ-UT symp, 2017 年 1 月
- (8) Yuki Goto, Artificial in vitro biosynthetic systems aiming at development of de novo natural product-like peptides, 第 23 回ペプチドフォーラム, 2017 年 1 月
- (9) Yuki Goto, Yasuharu Kato, Hiroaki Suga, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse modified backbones, Asian Chemical Biology Conference 2016, 2016 年 11 月
- (10) Yuki Goto, Artificial in vitro biosynthetic systems for elaboration of natural product-like peptides, 第 53 回ペプチド討論会, 2016 年 10 月
- (11) 後藤佑樹, 擬天然物創製を目指した人工生合成系の開発, 第 89 回日本生化学会大会「ペプチド機能設計と生化学のインタープレイ: 分子相互作用制御と生体応答」シンポジウム, 2016 年 9 月
- (12) 後藤佑樹, 人工生合成系を用いた擬天然物創製, 第 6 回合成生物学工学シンポジウム, 2016 年 7 月
- (13) 後藤佑樹, Artificial in vitro biosynthetic systems for elaboration of pseudo-natural products, 第 12 回生合成若手勉強会, 2016 年 7 月
- (14) 後藤佑樹, 試験管内人工生合成系を活用した擬天然物の創製, 日本薬学会第 136 年会「メタボライトとエピゲノム」シンポジウム, 2016 年 3 月
- (15) Yuki Goto, Yasuharu Kato, Hiroaki Suga, Artificial in vitro biosynthesis system for natural product-like peptides, The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 2016 年 1 月
- (16) 後藤佑樹, 加藤保治, 菅裕明, 翻訳系と修飾酵素と有機化学反応の融合で多彩な主鎖修飾ペプチドを作る, 第 18 回生命化学研究会, 2016 年 1 月

- (17) 後藤佑樹, 擬天然物の創成を見据えた人工生合成系の確立, 人工タンパク質の合成生物学ワークショップ@横浜理研, 2016年1月
- (18) Yuki Goto, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse heterocycles towards development of pseudo-natural products, Pacificchem 2015, 2015年12月
- (19) Yuki Goto, Yasuharu Kato, Hiroaki Suga, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse peptide-mimetic backbones, 7th International Peptide Symposium, 2015年12月
- (20) Yuki Goto, Hiroaki Suga, Incorporation of artificial amino acids by reconstitution of in vitro translation apparatus, Biochemistry and Molecular Biology 2015, 2015年12月
- (21) 後藤佑樹, 無細胞合成生物学による人工二次代謝産物の発見と生産, 第6回細胞構成研究会, 2015年9月
- (22) Yuki Goto, Artificial in vitro biosynthesis systems aiming at creation of pseudo natural products, ETH Zurich Bode laboratory seminar, 2015年6月
- (23) Yuki Goto, Yasuharu Kato, Hiroaki Suga, In vitro biosynthetic system for peptides with diverse backbone heterocycles, 16th International Symposium on Advancing the Chemical Science, 2015年6月
- (24) 後藤佑樹, 改変翻訳反応を用いた特殊環状ペプチドの合成～何を考えながら研究に取り組むべきか～, GEヘルスケア Life Sciences Academy はじめてのライフサイエンス基礎講座 2015, 2015年5月

〔図書〕(計3件)

- (1) 黒田知宏・後藤佑樹・菅裕明, 遺伝暗号リプログラミングによる人工翻訳系の創製, 人工細胞の創製とその応用 - シーエムシー出版 第4章 第2節 162-171 (2017).
- (2) 後藤佑樹, 擬天然物創製を見据えた人工生合成系の開発, 化学工業社, 化学工業, 2016, 799, 787.
- (3) 山田光博・梅本詩織・後藤佑樹・菅裕明, 特殊ペプチド創薬 - 第三の創薬シーズの可能性を拓く -, 東京化学同人, 現代化学, 2016, 4月号, 38.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計1件)

名称: アゾール誘電体骨格を有するペプチドの製造方法

発明者: 菅 裕明, 後藤 佑樹, 加藤 保治
 権利者: 国立大学法人東京大学
 種類: 特許
 番号: 特許 第 9783800 号
 取得年月日: 2017年10月10日
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

後藤 佑樹 (GOTO YUKI)
 東京大学・大学院理学系研究科・准教授
 研究者番号: 70570604