

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18233

研究課題名（和文）非アミド結合性ペプチドミメティック主鎖骨格の翻訳合成技術の開発

研究課題名（英文）Ribosomal synthesis of peptidomimetics bearing non-amide backbones

研究代表者

加藤 敬行（Kato, Takayuki）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・准教授

研究者番号：90567760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではリボソーム翻訳によってアミド結合以外による主鎖骨格の形成を実現することを目指した。具体的には  $\alpha$ -ヒドラジノ酸および  $\alpha$ -アミノキシ酸を用いたヒドラジノアミド結合、オキシアミド結合等の導入を実現した。さらに、 $\alpha$ -ヒドラジノ酸および  $\alpha$ -アミノキシ酸を複数導入したランダムペプチドライブラリを構築し、複数の疾患原因標的タンパク質に結合・阻害するペプチドのスクリーニングを実施した。また、得られたペプチドの標的タンパク質への結合力・阻害活性・血清安定性・膜透過性等の評価を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド医薬は、従来の有機小分子医薬並みの低い分子量と抗体医薬に匹敵する高い特異性を併せ持ち、新しい医薬品リード化合物として近年注目を集めている。一方で、天然型L- $\alpha$ -アミノ酸のみからなるペプチドにはペプチダーゼ耐性の低さや膜透過性の低さといった課題がある。本研究で確立した非アミド結合性ペプチドミメティック主鎖骨格翻訳合成技術により構築したライブラリを用いてmRNAディスプレイによるスクリーニングを行えば、ペプチダーゼ耐性や膜透過性の向上のみならず、標的タンパク質への結合力の向上も期待され、新規ペプチド医薬開発の有力なプラットフォームとなる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel methodology that enables ribosomal synthesis of peptidomimetics bearing non-amide backbones. We succeeded in introducing hydrazinoamide bond and oxyamide bond using  $\alpha$ -hydrazino acid and  $\alpha$ -aminoxy acid, respectively. Using this method, random peptide libraries containing multiple  $\alpha$ -hydrazino acids or  $\alpha$ -aminoxy acids have been constructed and applied to screening of peptides that bind to target proteins. The binding affinity, inhibitory activity, serum stability, and membrane permeability of the resulting peptides have also been evaluated.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ペプチド医薬 ヒドラジノ酸 アミノキシ酸 ペプチドミメティック 翻訳合成 リボソーム tRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチド医薬は、従来の有機小分子医薬並みの低い分子量と抗体医薬に匹敵する高い特異性を併せ持つことから、新しい医薬品リード化合物として近年非常に注目されている。しかしながら、ペプチド医薬品のさらなる実用化の促進に向けては、ペプチダーゼ耐性の低さや膜透過性の低さといった課題もある。これらの課題を克服するために、天然のアミド結合 (= ペプチド結合) 以外の結合様式により連結されたペプチドミメティック主鎖骨格の導入により機能を改善することが有効であると考えられる。

リボソーム翻訳においては、基質となるアミノ酸をアミド結合により順次連結することによりペプチド鎖が伸長される (図 1 A)。天然の翻訳系においては 20 種類の L- $\alpha$ -アミノ酸のみが基質として用いられるが、人工的に遺伝暗号を改変することにより、それ以外の非天然アミノ酸を基質とすることもでき、特にアミノ酸の側鎖の誘導体については既に様々なものが利用されている。一方、主鎖骨格に変異を導入することは一般により困難で、その事例は限られているが、アミド結合以外による主鎖骨格の形成も可能である。例えば、エステル結合形成が可能であることは比較的古くから知られている (図 1 B)、また、我々は本研究の開始直前にリボソーム翻訳によるチオエステル結合形成 (図 1 C: Takatsuji et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2019)) およびチオアミド結合形成 (図 1 D: Maini et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2019)) をそれぞれ初めて実現している。

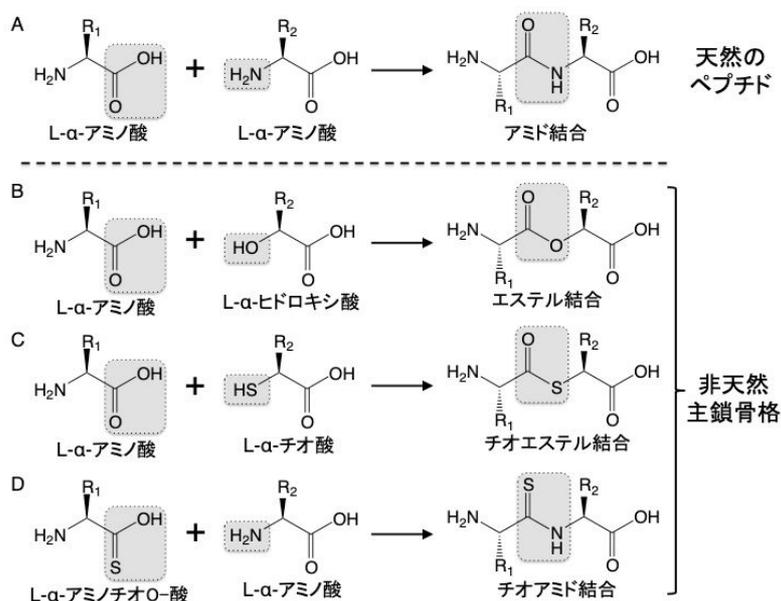


図 1: リボソームによる非天然主鎖骨格形成の例

### 2. 研究の目的

本研究ではリボソームの触媒能力をさらに拡張して、様々な非アミド結合性ペプチドミメティック主鎖骨格の形成を実現することを目的とした。リボソーム翻訳でペプチドミメティック化合物を合成する利点は、鋳型となる mRNA の配列を変えるだけで多様な配列のペプチドミメティック化合物を自在に合成できることにある。mRNA の配列をランダム化すれば、ランダムペプチドミメティック・ライブラリの構築も迅速かつ容易に可能である。このライブラリを mRNA ディスプレイ法と組み合わせることにより、標的となるタンパク質等に特異的に結合したり阻害したりするペプチドミメティック群を容易にスクリーニングすることができ、新規ペプチドミメティック医薬品へと展開できる。本研究では、実際にライブラリを構築し疾患原因タンパク質に対する配列のスクリーニングをし、得られた候補配列の活性評価まで行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究ではリボソーム翻訳により非天然型の主鎖骨格を持つペプチドミメティック化合物群の合成を目指した。具体的には、まずヒドラジノアミド結合およびオキシアミド結合の導入を目指した (図 2)。並行してウレア結合および炭素-炭素結合の実現にも挑戦した。リボソーム翻訳においては、遊離のアミノ酸を直接連結していくのではなく、アミノアシル tRNA ないしペプチジル tRNA の形で基質として利用する。リボソームの A サイトにアミノアシル tRNA が、P サイトにペプチジル tRNA がそれぞれ導入され、アミノアシル tRNA のアミノ基がペプチジル tRNA のカルボニル炭素に対して求核攻撃することによりアミド結合形成を開始する。反応後は A サ

イト側に新たなペプチジル tRNA が生じることになる。このペプチジル tRNA はトランスロケーションにより P サイトに移動し、A サイトには新たなアミノアシル tRNA が導入される。したがって、アミノ酸を非天然基質に置き換えて結合形成させる場合には、非天然基質を tRNA に連結した「非天然アシル tRNA」を調製し、リボソームに導入する必要がある。本研究では、①非天然アシル tRNA のリボソーム A サイトへの導入の可否および②リボソーム上での結合形成の可否を検討した。

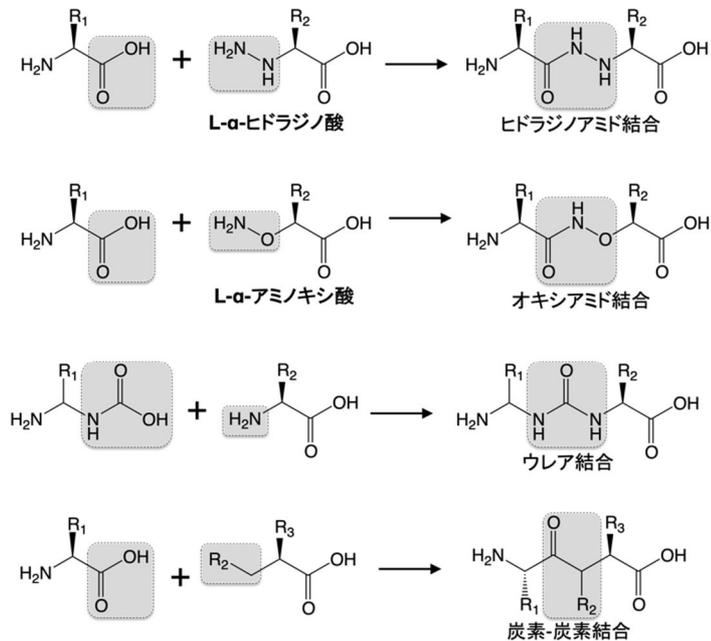


図2: 本研究で開発した非天然主鎖骨格

#### 4. 研究成果

まず①については、アミノアシル tRNA は翻訳因子の一つである EF-Tu によってリボソームの A サイトに運搬される。EF-Tu はアミノアシル tRNA のアミノ酸部分と tRNA の T ステム領域の 2 箇所を認識して結合する。このとき、非天然アシル tRNA の場合には基質部分と EF-Tu との結合力が弱いため、tRNA の T ステムの EF-Tu への結合力を強化することで A サイトへの導入効率の向上を図った (図 3)。過去に、T ステム配列の最適化により D-アミノ酸や β-アミノ酸の導入効率向上に成功しているため、同様の戦略を採った (Kato et al. *Nucleic Acids Res.* (2017), Kato et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2018))。

②については、非天然型の結合形成は通常のアミド結合形成の場合よりも困難であることが予想された。そして、リボソーム上での結合形成反応が遅い場合には、しばしば P サイトのペプチジル tRNA がリボソームから脱落してしまう現象 (= ドロップオフ) が起こる。そこで、ドロップオフを抑制するために翻訳因子の一つである EF-P を導入した。我々は EF-P が tRNA の D アーム領域を認識することを報告しており (Kato et al., *Nat. Commun.* (2016)) 非天然アシル tRNA の D アームに EF-P 認識配列を導入することでドロップオフを抑制した (図 3)。

上記の戦術により、リボソーム翻訳により α-アミノキシ酸および α-ヒドロキシ酸を導入し、ヒドロキサミアミド結合およびオキサミアミド結合を複数連続導入することに初めて成功した (Kato et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2021))。また、ウレア結合および炭素-炭素結合については現時点では実現できていないが引き続き検討中である。

さらには、このリボソーム翻訳技術を用いて -ヒドロキシ酸または -アミノキシ酸を複数含有するランダムペプチドライブラリを構築した。そして、mRNA ディスプレイ法を用い、このライブラリを複数の標的タンパク質に結合し阻害するペプチドのスクリーニングに適用した。配列解析の結果、複数の標的に対して有効な配列の候補が得られたため、ペプチドを化学合成によって大規模で調製し、標的タンパク質への結合力・阻害活性・血清安定性・細胞膜透過性等の評価を現在進めている。

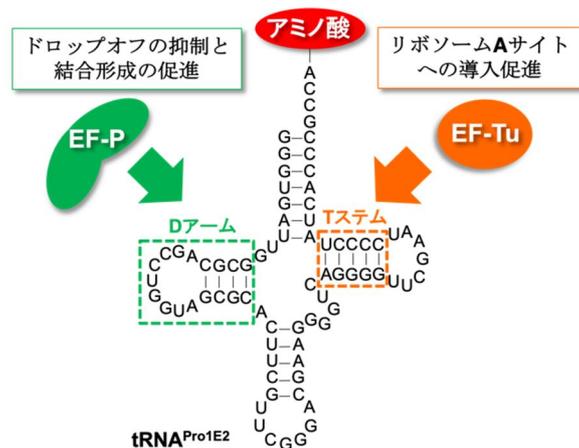


図3: 結合形成を促進するための新型人工tRNA

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 378
2. 論文標題 Ribosomal incorporation of negatively charged D- and N-methyl-L- amino acids enhanced by EF-Sep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20220038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rstb.2022.0038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Drop-off-reinitiation at the amino termini of nascent peptides and its regulation by IF3, EF-G, and RRF	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 663 ~ 674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079447.122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wakabayashi Risa, Kawai Marina, Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 144
2. 論文標題 In Vitro Selection of Macrocyclic / 3-Peptides against Human EGFR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18504 ~ 18510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 91
2. 論文標題 In Vitro Genetic Code Reprogramming for the Expansion of Usable Noncanonical Amino Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 221 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-biochem-040320-103817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Consecutive Ribosomal Incorporation of -Aminoxy/ -Hydrazino Acids with L/D-Configurations into Nascent Peptide Chains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18844 ~ 18848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c09270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 144
2. 論文標題 In Vitro Selection of Foldamer-Like Macrocyclic Peptides Containing 2-Aminobenzoic Acid and 3-Aminothiophene-2-Carboxylic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 2069 ~ 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c12133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Fine-tuning the tRNA anticodon arm for multiple/consecutive incorporations of -amino acids and analogs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkae219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Takashi, Malla Tika R, Brewitz Lennart, Tumber Anthony, Salah Eidarus, Lee Kang Ju, Terasaka Naohiro, Owen C David, Strain-Damereil Claire, Lukacik Petra, Walsh Martin A, Kawamura Akane, Schofield Christopher J, Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 未定
2. 論文標題 Cyclic 2,3-amino acids improve the serum stability of macrocyclic peptide inhibitors targeting the SARS-CoV-2 main protease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bulcsj/u0ae018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 51
2. 論文標題 A comprehensive analysis of translational misdecoding pattern and its implication on genetic code evolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10642 ~ 10652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 51
2. 論文標題 Translation initiation with exotic amino acids using EF-P-responsive artificial initiator tRNA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8169 ~ 8180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松本 聡美, 加藤 敬行, 菅 裕明
2. 発表標題 -ヒドラジノ酸含有ペプチドライブラリの翻訳合成と薬剤候補探索への適用
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 Takashi Miura, Takayuki Katoh, Hiroaki Suga
2. 発表標題 Ribosomal synthesis of macrocyclic D/L- / / -hybrid peptide libraries for discovery of IFNGR1 inhibitors
3. 学会等名 IPS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satomi Matsumoto, Takayuki Katoh, Hiroaki Suga
2. 発表標題 In Vitro Selection of Macrocyclic Peptides Containing $\alpha$ -Hydrazino Acid for Exploration of Drug Candidates
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Alexis D. Richaud, Takayuki Katoh, Hiroaki Suga
2. 発表標題 RaPID 2.0: Going beyond the current accessible space of mRNA display
3. 学会等名 Gordon conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 會澤彩圭、R. H. P. van Neer、加藤敬行、菅裕明
2. 発表標題 剛直な開始基質を導入したダンベル型環状ペプチドライブラリの 翻訳合成と薬剤候補探索の適用
3. 学会等名 第55回 若手ペプチド夏の勉強会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平嶋 瞭一, 加藤 敬行, 菅 裕明
2. 発表標題 非天然アミノ酸の効率的な翻訳導入に向けた tRNAのアンチコドンシステムの最適化
3. 学会等名 第55回 若手ペプチド夏の勉強会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------