

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 25 年度

課題番号：21000005

研究課題名 (和文) 特殊ペプチド創薬

研究課題名 (英文) Non-standard peptide-probe discovery

研究代表者

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：00361668

交付決定額 (研究期間全体)：(直接経費) 406,700,000 円、(間接経費) 123,220,000 円

研究成果の概要 (和文)：本研究では、申請者が 10 年に渡り研究を推進してきたフレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミングの基盤技術をさらに飛躍発展させ、mRNA 鋳型依存的に天然物ライクな特殊ペプチドライブラリーを自在に合成する技術とその網羅的探索技術、RaPID システムを開発する。さらに、その創薬応用を展開する事で特殊ペプチドによるケミカルバイオテクノロジーの新時代を築く。

研究成果の概要 (英文)：This research project aims at developing the genetic code reprogramming technology based on the flexizyme system and expressing natural product-like macrocyclic peptides from mRNA libraries. Moreover, an in vitro display system, referred to RaPID (Random nonstandard Peptide Integrated Discovery) system, has been established to apply for massive screenings of macrocyclic peptides generated by the above technology. This has enabled us to discover molecular probes against various drug targets, leading to a new era of chemical biology.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：天然物有機化学、生理活性物質、生体高分子、生化学、ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

1999 年に申請者が独自に単離・同定した tRNA アシル化 RNA 酵素・フレキシザイムの開発により、特殊アミノ酸を自在に tRNA にアミノアシル化できるようになり、遺伝暗号表のリプログラミングが可能になっていた。さらに、このフレキシザイムを再構成無細胞翻訳系と組み合わせることにより、環状特殊ペプチドの翻訳合成法 (FIT システム) が確立できていた。研究計画の申請時には、この技術を mRNA ディスプレイ法と組み合わせることで、任意の標的蛋白質に結合する特殊ペプチドの探索法、RaPID システム基盤技術の完成間近にあった。本研究計画では、RaPID システムの確立後、新たにこのシステムの高度化を目指した研究とその応用の 2 本柱を並行して進めることで、創薬の革新ツールとして実証し、特殊ペプチド創薬という新潮流の確立を目指すこととした。

2. 研究の目的

- (1) 両親媒性環状特殊ペプチドの合成技術開発
- (2) リボソームによる炭素・炭素結合形成技術開発によるポリケチド骨格含有特殊ペプチドの合成
- (3) 上記特殊ペプチドライブラリーの合成と網羅探索系の融合
- (4) 生理活性特殊ペプチドの探索

3. 研究の方法

- (1) 非ペプチド性疎水性架橋基を大環状ペプチド鎖に導入することで、両親媒性機能を持ちうる特殊ペプチドの翻訳合成技術の確立を目指す。本計画では、上記の特殊ペプチド合成法を確立することで RaPID 技術に組み込み、標的蛋白質に高親和性を有する活性種の探索を可能にすると同時に、ペプチドのパッシブな膜透過が可能かを検討する。
- (2) 種々の活性 α プロトンをもつアシル

化合物のジニトロベンジルエステル誘導体を合成し、フレキシザイムを用いて伸張オルソゴナル tRNA にアシル化することで、リボソーム内で炭素-炭素結合形成が可能か検討する。本計画では、リボソーム中でクライゼン縮合を触媒することができるか検証すると同時に、非ペプチド骨格を有する特殊ペプチドの翻訳合成に向けた技術確立の第一歩を達成する。

(3)本計画では、上記で開発された新技術を、RaPID システムと融合することで、これまでとは全く異なる特殊ペプチドライブラリーの合成法と活性種探索法技術の確立を目指す。また、初年度では RaPID システムをより高度で信頼度の高い技術へと進化させる。

(4)本計画では、RaPID システムを活用して、様々な薬剤標的蛋白質に対し活性種特殊ペプチドを探索することで、RaPID システムの実績を積むことで本技術の薬剤探索の有用性を実証する。同時に(3)で構築された技術の検証も行い、細胞膜透過の向上を付与した特殊ペプチドの発見に導く。

4. 研究成果

(1)当初計画していたファルネシル酸誘導体を架橋基に用いた環状ペプチドの翻訳合成法の確立には成功したものの、架橋基自体の合成の困難さと探索後の特殊ペプチド化学合成の多難さから、よりシンプルな非ペプチド性架橋基への変更を決めた。これまでに非ペプチド性架橋基5種類の化学合成を達成し、それぞれを用いた両親媒性環状特殊ペプチドの翻訳合成に成功した。既に(3)との融合も完了し、またそのうち2種類の架橋基を用いた環状化特殊ペプチドについては、活性種探索にも成功した。平成26年度にはこれらの成果の一部が論文として発表に至った(論文⑧)。

(2)申請書の中でも記載したが、本計画はハイリスク・ハイリターン研究と位置づけた。これまで計画書に記載した実験計画は全て実行に移し検証したが、残念ながらいずれの計画も期待した炭素-炭素結合を形成したことを示唆する実験データは得られなかった。一方、本計画の長期的目標は、非ペプチド骨格をもつ擬天然物特殊ペプチドの合成でもある。本計画のバックアップとして、PatDを用いて翻訳されたペプチド鎖を修飾シアゾール環含有ペプチドの合成技術の確立を目指した。その結果、PatDの基質認識におけるこれまで提唱されていた仮説を覆す興味深い成果が得られ、しかもアゾール含有特殊ペプチドライブラリーの構築も可能にする基礎データの蓄積ができた。平成26年度にはこれらの成果の一部が論文として発表に至った(論文①⑫⑭)。

(3)これまでに(1)で開発した架橋基の導

入による新規大環状特殊ペプチドライブラリーの構築に成功し、またそのうち2種の架橋基を用いた技術については、PAD2(アルギニン側鎖加水分解酵素)およびPCNA(DNA複製に関与するタンパク質)に対して、活性種探索も推進した。これらの結果は現時点では未発表で、活性評価がまとまり次第、発表する。

(4)本計画では、特別推進研究の初年度で開発が完了した RaPID システムを用いて、様々な薬剤標的に対して生理活性特殊ペプチドの探索を行った。これらの成果の一部は、平成24~26年度にかけて多くの原著論文と総説論文(論文③④⑦⑪⑬)で発表した。特に平成25年度にはまた、特殊ペプチドが結合するタンパク質との共結晶 X線3次元解析が4件成功し、論文の発表に至り(論文⑤⑥⑨⑩)、国内外の多くの研究者から注目を集めた。現在も20を超える種類の蛋白質を標的として特殊ペプチド活性種の探索が常時進行しており、特別推進終了後もその成果が次々と報告できると確信している。

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 15件)

- ① Y. Goto, Y. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, H. Suga, One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase SIRT2, Chemistry and Biology 査読有 in press, 2014, DOI未確定
- ② N. Terasaka, G. Hayashi¹, T. Katoh, and H. Suga, An orthogonal ribosome-tRNAs pair via the engineering of peptidyl transferase center, Nature Chemical Biology 査読有 in press, 2014, DOI未確定
- ③ T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides, Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides 査読有 in press, 2014, DOI未確定
- ④ C. J. Hipolito, N. K. Bashiruddin, H. Suga, Protein cocrystallization molecules originating from in vitro selected macrocyclic peptides, Current Opinion in Structural Biology 査読有 26, 2014, pp.24-31, DOI: 10.1016/j.sbi.2014.03.001
- ⑤ A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K.

- Sakiyama, C.J. Hipolito, A. Fujioka, R. Hirokane, K. Ikeguchi, B. Watanabe, J. Hiratake, Y. Kimura, H. Suga, K. Ueda, H. Kato, Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 査読有 111, 2014, pp. 4049-4054, DOI未確定
- ⑥ K. Yamagata, Y. Goto, H. Nishimasu, J. Morimoto, R. Ishitani, N. Dohmae, N. Takeda, R. Nagai, I. Komuro, H. Suga, O. Nureki, Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocytic Peptide Inducing Dynamic Structural Change, *Structure* 査読有 22, 2014, pp. 345-352, DOI: 未確定
- ⑦ N. Terasaka, H. Suga, Flexizymes-facilitated genetic code reprogramming leading to the discovery of drug-like peptides, *Chemistry Letters* 査読有, 43, 2014, pp. 11-19, DOI未確定
- ⑧ Y. Goto, M. Iseki, A. Hitomi, H. Murakami, and H. Suga, Non-standard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons, *ACS Chemical Biology* 査読有 8, 2013, pp. 266, pp. 719, DOI: 10.1021/cb400549p
- ⑨ C. J. Hipolito, Y. Tanaka, T. Katoh, O. Nureki, H. Suga, A macrocyclic peptide that serves as a cocrystallization ligand and inhibits the function of a MATE family transporter, *Molecules* 査読有 18, 2013, pp.10514-10530, DOI: 10.3390/molecules180910514
- ⑩ Y. Tanaka, C.J. Hipolito, A.D. Maturana, K. Ito, T. Kuroda, T. Higuchi, T. Katoh, H.E. Kato, M. Hattori, K. Kumazaki, T. Tsukazaki, R. Ishitani, H. Suga, O. Nureki, Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter, *Nature* 査読有 496, 2013, pp. 247-251, DOI: 10.1002/chem.201300247
- ⑪ T. Passioura, H. Suga, Flexizyme-mediated genetic reprogramming as a tool for noncanonical Peptide synthesis and drug discovery, *Chemistry European Journal* 査読有 19, 2013, pp. 6530-6536, DOI:10.1002/chem.201300247
- ⑫ T. Kawakami, T. Ishizawa, T. Fujino, P.C. Reid, H. Suga, H. Murakami, In Vitro Selection of Multiple Libraries Created by Genetic Code Reprogramming To Discover Macrocytic Peptides That Antagonize VEGFR2 Activity in Living Cells, *ACS Chemical Biology* 査読有 8, 2013, pp.1205-1514, DOI: 10.1021/cb300697h
- ⑬ K. Ito, T. Passioura, H. Suga, Technologies for the synthesis of mRNA-encoding libraries and discovery of bioactive natural product-inspired non-traditional macrocyclic peptides, *Molecules* 査読有, 18, 2013, pp. 3502-3528, DOI: 10.3390/molecules18033502
- ⑭ T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami, Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation, *Journal of American Chemical Society* 査読有 135, 2013, pp. 1830-1837, DOI: 10.1021/ja309570x
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, AsiaTIDES, 2. Plenary Lecture (招待講演), 2/25, 2014, シェラトン都ホテル東京 (東京都港区)
- ② 菅 裕明, 擬天然物の新機能創出分子技術, 日本化学会第 94 春期年会「社会持続的発展のための分子技術」(招待講演), 3/29, 2014, 名古屋大学東山キャンパス (名古屋市)
- ③ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Symposium on Foldamers (招待講演), 4/9-4/12, 2013, Les Cordeliers Conference Centre (Paris, France)
- ④ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, RIKEN-Max Planck Joint Symposium (招待講演), 4/16, 2013, 理化学研究所和光研究所 (埼玉県和光市)
- ⑤ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, 5th Gratama Workshop (招待講演), 5/30, 2013, 東京工業大学大岡山キャンパス (東京都目黒区)
- ⑥ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Gordon Research Conference, Bioorganic Chemistry (招待講演), 6/13, 2013, Proctor Academy (New Hampshire, USA)

- ⑦ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, American Peptide Symposium 2013 (招待講演), 6/23, 2013, Hilton Waikoloa Village (Hawaii, USA)
- ⑧ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Keynote Lecture, Symposium on Chemoselective Reactions for the Synthesis and Application (招待講演), 7/2-7/5, 2013, Max Planck Institute (Dortmund, Germany)
- ⑨ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, International Conference on Structural Genomics 2013, Structural Life Science (招待講演), 7/29-8/1, 2013, 京王プラザホテル (北海道札幌)
- ⑩ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Current Strategy for Development of Biopharmaceuticals and Small Molecule Drugs (招待講演), 8/1-8/2, 2013, 北海道大学 (北海道札幌)
- ⑪ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, "Jokichi Takamine" 130 years of Glasgow-Japan Collaboration (招待講演), 9/5-9/6, 2013, University of Glasgow (Glasgow, UK)
- ⑫ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, ACS National Meeting (招待講演), 9/9, 2013, Indiana Convention Center (Indianapolis, USA)
- ⑬ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Lilly Distinguished Lecturer at Colorado State University (招待講演), 9/10, 2013, Colorado State University (Fort Collins, US)
- ⑭ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Biochemistry Seminar of University of Colorado, BioFrontier Institute (招待講演), 9/11, 2013, University of Colorado (Boulder, USA)
- ⑮ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, RiboClub (招待講演), 9/22, 2013, Hotel Cheribourg (Quebec, Canada)
- ⑯ 菅 裕明, Discovery of natural

product-like peptides accelerated by RaPID system, Solvay Conference of "New Chemistry and New Opportunities from the Expanding Protein Universe" (招待講演), 10/15-19, 2013, International Solvay Institute (Brussels, Belgium)

⑰ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Basel Chemical Society Lectureship (招待講演), 10/24, 2013, Medicinal Chemistry Navartis Institute (Basel, Switzerland)

⑱ 菅 裕明, Discovery of natural product-like peptides accelerated by RaPID system, Korean Peptide Protein Society Meeting (招待講演), 11/29, 2013, Seoul National University (Seoul, Korea),

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: MATE 活性阻害ペプチド
 発明者: 菅裕明、濡木理、ヒポリト クリストファー、田中良樹
 権利者: 東京大学
 種類: PCT/JP2013
 番号: 070779
 出願年月日: 25 年 7 月 28 日
 国内外の別: 国外

名称: 大環状ペプチド、その製造方法、及び大環状ペプチドライブラリを用いるスクリーニング方法
 発明者: 菅裕明
 権利者: 東京大学
 種類: 特願 2013
 番号: 174906
 出願年月日: 25 年 8 月 26 日
 国内外の別: 国内

名称: C-Met タンパク質アゴニスト
 発明者: 菅裕明、伊藤健一郎
 権利者: 東京大学
 種類: 特願-2013
 番号: 214771
 出願年月日: 25 年 10 月 15 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 安定化された二次構造を有するペプチ

ド、及びペプチドライブラリー、それらの製造方法

発明者：菅裕明、樋口岳

権利者：東京大学

種類：特願 2012

番号：546968 (JP), 13/990123 (US),
11845198. 8 (EP), 201180058284. 4 (CN)

取得年月日：23 年 12 月 5 日（国によって異なる）

国内外の別： 国内・海外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/biorig/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 菅 裕明 (Suga Hiroaki)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：00361668

(2) 研究分担者 なし