

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870146

研究課題名(和文)細胞内生体分子を標的とする大環状Nアルキルペプチドの高速試験管内分子進化

研究課題名(英文)Directed evolution of cyclized N-alkyl peptides targeted to cellular biomolecules

研究代表者

川上 隆史(Kawakami, Takashi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究員

研究者番号：60638881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌由来の再構成型無細胞翻訳系(PUREシステム)にプロリンの重合を促進するElongation factor P(EF-P)を加えることにより、mRNAディスプレイ型多環状Nアルキルペプチドライブラリー内の各環状Nアルキルアミノ酸の翻訳効率を評価することに成功した。

また、翻訳後の生体直交性化学反応あるいは酵素反応により、荷電Nアルキルアミノ酸の翻訳ペプチドへの効率的な構築に成功した。

PUREシステムにmRNAディスプレイ法を組み合わせることにより、生きたヒト細胞に発現するタンパク質(VEGFR2)を標的とする大環状Nアルキルペプチドの試験管内分子進化に成功した。

研究成果の概要(英文)：By the addition of elongation factor P (EF-P) to an E. coli reconstituted cell-free translation system, PURE system (Protein-synthesis Using Recombinant Elements system), we successfully evaluated translation efficiency of cyclic N-alkyl amino acids in a library of mRNA-displayed highly N-alkylated polycyclic peptidomimetics.

By using bio-orthogonal chemical reaction or enzymatic reaction, we developed a novel method to incorporate electorically-charged N-alkyl amino acids to ribosomally synthesized peptides.

By combining the PURE system with an mRNA display method, we successfully in vitro-evolved cyclized N-alkyl peptides targeted to VEGFR2 expressed in living human cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー・生体関連化学

キーワード：PUREシステム mRNAディスプレイ Nメチルペプチド Elongation factor P 分子進化 ペプチド Nアルキルペプチド プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

これまでに研究代表者は、大腸菌由来の再構成型無細胞翻訳系 (PURE システム) を駆使することによって、Nメチルペプチド骨格 (Kawakami et al., Chem. Biol., 15, 32, 2008)、ペプトイド骨格 (Kawakami et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 16861, 2008)、そして、大環状骨格 (Kawakami et al., Nat. Chem. Biol., 5, 888, 2009) の翻訳産物への構築に成功してきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、PURE システムに高速試験管内分子進化法である mRNA ディスプレイ法を組み合わせることによって、生きたヒト細胞に発現するタンパク質を標的とする大環状 N アルキルペプチド化合物の創製を試みた。

3. 研究の方法

PURE システムを用いて、化学合成した環状 N アルキルアミノ酸の基質特異性を評価し、荷電 N アルキルアミノ酸の翻訳産物への構築を試みた。また mRNA ディスプレイ法と組み合わせることによって、大環状 N アルキルペプチドの高多様性ライブラリーを翻訳合成し、ガンに関連する血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (VEGFR2) を標的とする大環状 N アルキルペプチド化合物の分子進化を行なった。

4. 研究成果

(1) 環状 N アルキルアミノ酸の活性エステル体を化学合成後、tRNA に連結して PURE システムに加え、放射性同位体標識を用いた翻訳ペプチド合成量の定量的評価を行なった結果、高効率で導入可能な環状 N アルキルアミノ酸を同定することに成功した。また質量分析による分子量同定により、目的の環状 N アルキルアミノ酸が導入されていることも確認した。更に質量分析により連続導入が可能な環状 N アルキルアミノ酸の同定にも成功した。また PURE システムの構成要素を改変することによって、様々な構造を持つ環状 N アルキルアミノ酸を含む多環 N アルキルペプチドの翻訳合成を達成した。更に PURE システムに、プロリンの重合効率を向上させる新規翻訳伸長因子 Elongation Factor P (EF-P) を加えることによって、mRNA ディスプレイ型の多環 N アルキルペプチドライブラリーを翻訳合成し、次世代シーケンサーを用いた大量配列解析により、ライブラリー内の各環状 N アルキルアミノ酸の翻訳効率を評価することにも成功した。

(2) 正荷電 N アルキルアミノ酸のアミノ基をアジド基に変換した活性エステル体を化学合成し、PURE システムに加え、放射性同位体標識を用いた翻訳ペプチド合成量の定量的評価を行なった結果、アジド含有 N アル

キルアミノ酸の高効率な翻訳導入を観察することができた。同様に、負荷電 N アルキルアミノ酸のカルボン酸をメチルエステルあるいはベンジルエステルに変換した活性エステル体を化学合成し、PURE システムに加え、放射性同位体標識を用いた翻訳ペプチド合成量の定量的評価を行なった結果、エステル含有 N アルキルアミノ酸の高効率な翻訳導入を観察することができた。また質量分析による分子量同定により、目的の N アルキルアミノ酸が導入されていることも確認した。更に、水溶性ホスフィンを用いた生体直交性化学反応、あるいは、カルボキシエステラーゼを用いた酵素反応を作用させることにより、正荷電アミノ基含有 N アルキルアミノ酸、および、負荷電カルボン酸含有 N アルキルアミノ酸の翻訳ペプチドへの導入に成功した。また質量分析により、これらの荷電 N アルキルアミノ酸は連続導入が可能であることも明らかにした。更に mRNA ディスプレイ法と組み合わせることにより、荷電 N アルキルアミノ酸を持つ mRNA ディスプレイ型ペプチドの翻訳合成にも成功した。

(3) PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用い、ヒト細胞ライセートのドットブロッキング解析および培養ヒト細胞の DNA ラベリング解析により、生きたヒト細胞に発現する VEGFR2 を阻害する大環状 N アルキルペプチドの分子進化に成功した。また分子進化により、高活性 VEGFR2 阻害ペプチドが多数の環状 N アルキルアミノ酸を有することも明らかにした (図 1 および 2)。更にヒト細胞ライセートからの免疫沈降・ウェスタンブロッキング解析により、VEGFR2 を標的とする大環状 N アルキルペプチドがタンパク質・タンパク質間相互作用を阻害していることも明らかにした。

	Frequency
T V S H P D P W V N G L W I R C	1
T V Y H P D P W V N G L W I R C	1
T V W H P D P W V N G L W I Y C	1
E V K H P D P W V N G L W I Y C	1
T V V H P D P W V N G L W I S C	1
T V R H P D P W V N G L W L S C	1
T V R H P D P W V N G L W F S C	1
T V S H P D P W V N G L W L Q C	1
T V T H P D P W V N G L W L P C	2
T V T H P D P W V N G L Y L P C	1
T V Y H P D P W V N G L W L P C	1
T V V H P D P W V N G L W L P C	1
T V F H P D P W V N G L W I P C	1
A V T H S D P W V N G L W L P C	1
T V T H S D P W V N G L W F P C	1
E V S H P D P W V N G L W F P C	1
A V S H P D P W V N G L W F P C	1
S V V H H D P W V N G L W F P C	1

図 1 VEGFR2 を阻害する N-クロロアセチル-L-フェニルアラニン環状化ペプチドの配列

	Frequency
L Y G Y R V K V H P I S L E P C	1
I G I Y R V K V H P I S L E P C	1
I G P Y R V K V H P I S L E P C	4
I G P Y W V K V H P I S L E P C	1
I G P Y R V K V H P V S L E P C	4
I G P Y R I K V H P V S L E P C	1
V G P Y R V K V H P V S L E P C	1
I G P Y V V K V H P V S L E P C	1
I G P Y R V K V H P V S L E Y C	1
I G P Y W V K V H P V S L E W C	5
I N G Y Y V K V H P V S L D W C	1

図2 VEGFR2 を阻害する N-クロロアセトアミドベンゾイル-L-フェニルアラニン環状化ペプチドの配列

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

- ① Takashi Kawakami, Koji Ogawa, Tomohisa Hatta, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor
ACS Chemical Biology, 11, in press, 2016
DOI: 10.1021/acschembio.5b01014
査読有り
- ② Takashi Kawakami, Shinya Ito, Naoki Goshima, Kazuhiro Nagata, and Tohru Natsume
Post-translational modification mapping of collagen that binds to HSP47 by directed ligand evolution and DNLC mass spectrometry
Peptide Science, 52, 321-322, 2015
査読有り
- ③ Takashi Kawakami, Kazuma Murakami, Daiki Sakamoto, Mizuho Hanaki, Tohru Natsume, and Kazuhiro Irie
In vitro display evolution of cyclized peptidomimetics targeted to a chemically synthesized amyloid beta protein dimer
Peptide Science, 52, 323-324, 2015
査読有り
- ④ Takashi Kawakami, Shungo Adachi, Koji Ogawa, Tomohisa Hatta, Tai Kubo, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Proteomic Mapping of Biological Complexes Using Directed Ligand Evolution and Ultra-High Sensitive

Mass Spectrometry

Peptide Science, 51, 339-340, 2014
査読有り

- ⑤ Takashi Kawakami, Toru Sasaki, Reid C. Patrick, and Hiroshi Murakami
Incorporation of electrically charged N-alkyl amino acids into ribosomally synthesized peptides via post-translational conversion
Chemical Science, 5, 887-893, 2014
DOI: 10.1039/c3sc52744a
査読有り
- ⑥ Takashi Kawakami
Directed evolution of tRNA-aminophosphonating ribozymes for ribosomal phosphono-peptide synthesis
Peptide Science, 51, 337-338, 2014
査読有り
- ⑦ Takashi Kawakami, Takahiro Ishizawa, and Hiroshi Murakami
Extensive Reprogramming of the Genetic Code for Genetically Encoded Synthesis of Highly N-Alkylated Polycyclic Peptidomimetics
Journal of the American Chemical Society, 135, 12297-12304, 2013
DOI: 10.1021/ja405044k
査読有り
- ⑧ Naohiro Taniguchi, Sayumi Nakayama, Takashi Kawakami, and Hiroshi Murakami
Patch cloning method for multiple site-directed and saturation mutagenesis
BMC Biotechnology, 13, 91, 2013
DOI: 10.1186/1472-6750-13-91
査読有り
- ⑨ Takashi Kawakami, Toru Sasaki, Reid C. Patrick, and Hiroshi Murakami
Ribosomal synthesis of charged N-alkyl amino acid-containing peptides
Peptide Science, 50, 423-424, 2013
査読有り
- ⑩ Takashi Kawakami, Takahiro Ishizawa, and Hiroshi Murakami
Ribosomal incorporation of diverse cyclic N-alkyl amino acids
Peptide Science, 50, 427-428, 2013
査読有り
- ⑪ Takahiro Ishizawa, Takashi Kawakami, and Hiroshi Murakami
High-speed *in vitro* selection and evolution of functional polypeptides using TRAP display

Peptide Science, 50, 425-426, 2013
査読有り

- ⑫ Takashi Kawakami, Takahiro Ishizawa, Tomoshige Fujino, Parick C. Reid, Hiroaki Suga, and Hiroshi Murakami
In Vitro Selection of Multiple Libraries Created by Genetic Code Reprogramming To Discover Macrocyclic Peptides That Antagonize VEGFR2 Activity in Living Cells
ACS Chemical Biology, 8, 1205-1214, 2013
DOI: 10.1021/ja405044k
査読有り

- ⑬ Takahiro Ishizawa, Takashi Kawakami, and Hiroshi Murakami
TRAP Display: A High-Speed Selection Method for the Generation of Functional Polypeptides
Journal of the American Chemical Society, 135, 5433-5440, 2013
DOI: 10.1021/ja312579u
査読有り

[学会発表] (計 19 件)

- ① 川上隆史
試験管内分子進化法を用いた PPI 阻害環状 N アルキルペプチド化合物の創製
新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム～天然物ケミカルバイオロジーの更なる発展を目指して～ (招待講演)
2016年2月23日
京都大学 (京都府京都市)
- ② Takashi Kawakami, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Directed evolution of antibody-like peptides for proteomics
The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies
2015年12月15日
Honolulu (USA)
- ③ 川上隆史、伊藤進也、五島直樹、永田和宏、夏目徹
無細胞分子進化法と超高感度質量分析を用いた翻訳後修飾の網羅的解析
日本ペプチド学会第52回ペプチド討論会
2015年11月16日
平塚中央公民館 (神奈川県平塚市)
- ④ 川上隆史、村上一馬、阪本大樹、花木瑞穂、夏目徹、入江一浩
アミロイドβ二量体を標的とする非天然型環状ペプチドの試験管内分子進化
日本ペプチド学会第52回ペプチド討論

会
2015年11月16日
平塚中央公民館 (神奈川県平塚市)

- ⑤ 川上隆史
進化分子工学と有機合成化学を基盤とするペプチドツール創製システムの構築
BioJapan2015 World Business Forum (招待講演)
2015年10月15日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑥ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
タンパク質ラベリング用ペプチドタグの進化分子工学的創製システムの構築
日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会
2015年6月10日
東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑦ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
プロテオミクスアプローチによるタンパク質間相互作用阻害剤の同定
「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第8回公開シンポジウム
2015年6月8日
東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑧ Takashi Kawakami, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Directed Evolution of Natural Product-Like Peptides
The 3rd International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity
2014年10月28日
千里ライフサイエンスセンタ (大阪府豊中市)
- ⑨ 川上隆史、足達俊吾、小川浩二、八田知久、久保泰、五島直樹、夏目徹
試験管内分子進化と超高感度質量分析システムを用いた蛋白質複合体の解析
日本ペプチド学会第51回ペプチド討論会
2014年10月22日
徳島大学 (徳島県徳島市)
- ⑩ 川上隆史
ホスホノペプチドの翻訳合成に向けた tRNA アミノホスホニル化リボザイムの分子進化
日本ペプチド学会第51回ペプチド討論会
2014年10月22日
徳島大学 (徳島県徳島市)
- ⑪ 川上隆史、五島直樹、夏目徹

- 天然物様ペプチドライブラリーからのリ
ガンド探索法の開発
「天然物ケミカルバイオロジー～分子標
的と活性制御～」第6回公開シンポジウ
ム
2014年5月28日
名古屋大学（愛知県名古屋市）
- ⑫ 石沢堯大、川上隆史、村上裕
高速試験管内進化法の開発と新規機能性
ポリペプチドの探索への応用
第36回日本分子生物学会年会
2013年12月5日
神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
- ⑬ Takashi Kawakami, Toru Sasaki, Reid C.
Patrick, and Hiroshi Murakami
Ribosomal synthesis of charged N-alkyl
amino acid-containing peptides
The 4th Asia-Pacific International
Peptide Symposium
2013年11月7日
ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田
市）
- ⑭ Takashi Kawakami, Takahiro Ishizawa,
and Hiroshi Murakami
Ribosomal incorporation of diverse
cyclic N-alkyl amino acids
The 4th Asia-Pacific International
Peptide Symposium
2013年11月7日
ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田
市）
- ⑮ Takahiro Ishizawa, Takashi Kawakami,
and Hiroshi Murakami
High-speed *in vitro* selection and
evolution of functional polypeptides
using TRAP display
The 4th Asia-Pacific International
Peptide Symposium
2013年11月7日
ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田
市）
- ⑯ 川上隆史、石沢堯大、藤野公茂、菅裕明、
村上裕
高速試験管内進化分子工学法を用いた血
管内皮細胞増殖因子受容体阻害ペプチド
の開発
第7回バイオ関連化学シンポジウム
2013年9月27日
名古屋大学（愛知県名古屋市）
- ⑰ 石沢堯大、川上隆史、村上裕
高速試験管内進化分子工学法を用いた大
規模ペプチドライブラリーの構築
第7回バイオ関連化学シンポジウム
2013年9月27日

名古屋大学（愛知県名古屋市）

- ⑱ 川上隆史、石沢堯大、藤野公茂、パトリ
ック・リード、菅裕明、村上裕
新規機能性ポリペプチドの探索を指向し
た高速試験管内進化分子工学法の開発
日本ケミカルバイオロジー学会第8回
年会
2013年6月20日
東京医科歯科大学（東京都文京区）
- ⑲ 石沢堯大、川上隆史、村上裕
新規機能性ポリペプチドの探索を指向し
た高速試験管内進化分子工学法の開発
日本ケミカルバイオロジー学会第8回
年会
2013年6月20日
東京医科歯科大学（東京都文京区）

〔図書〕（計1件）

- ① 石沢堯大、川上隆史、村上裕
株式会社エヌ・ティー・エス
進化分子工学～高速分子進化によるタン
パク質・核酸の開発 第3編-第4章-第4
節、2013
高速試験管内進化分子工学法—TRAP
display の開発と血管新生阻害ペプチド
創製への応用

〔産業財産権〕

○出願状況（計6件）

名称：Production method for charged
non-protein amino acid-containing peptide
発明者：Hiroshi Murakami, Takashi Kawakami,
Patrick Reid, Toru Sasaki
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/070487
出願年月日：平成26年8月4日
国内外の別：海外

名称：METHOD FOR PRODUCING PEPTIDE LIBRARY,
PEPTIDE LIBRARY, AND SCREENING METHOD
発明者：Hiroshi Murakami, Takashi Kawakami,
Patrick Reid, Toru Sasaki
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/062604
出願年月日：平成26年5月12日
国内外の別：海外

名称：Peptide for inhibiting vascular
endothelial growth factor receptor
発明者：Hiroshi Murakami, Takashi Kawakami,
Takahiro Ishizawa, Hiroaki Suga, Patrick
Reid
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2013/073471

出願年月日：平成 25 年 9 月 3 日
国内外の別：海外

名称：荷電性非タンパク質性アミノ酸含有ペプチドの製造方法
発明者：村上裕、川上隆史、パトリック・リード、佐々木亨
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-162440
出願年月日：平成 25 年 8 月 5 日
国内外の別：国内

名称：ペプチドライブラリの製造方法、ペプチドライブラリ、及びスクリーニング方法
発明者：村上裕、川上隆史、パトリック・リード、佐々木亨
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-100661
出願年月日：平成 25 年 5 月 10 日
国内外の別：国内

名称：血管内皮細胞増殖因子受容体阻害ペプチド
発明者：村上裕、川上隆史、石沢堯大、菅裕明、パトリック・リード
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-193453
出願年月日：平成 24 年 9 月 3 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
<http://researchmap.jp/takakawa/>
<http://www.molprof.jp/~kawakami/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)
産業技術総合研究所・創薬分子プロファイリング研究センター・研究員
研究者番号：60638881

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし