

課題番号 LR011

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成25年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	特殊ペプチド増幅法の開発と創薬への応用
研究機関・ 部局・職名	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
氏名	村上 裕

1. 当該年度の研究目的

前年度迄に、リボソームのD体アミノ酸に対する特性評価、高速分子進化法 (TRAP display)、血管新生剤阻害剤の開発に成功した。本年度はさらに、これ迄に開発した方法を最大限に生かし、抗菌剤の開発、遺伝暗号リプログラミングの改良、リボソームの更なる特性評価を行うことを目指す。これにより本研究プログラムの大部分の目標が達成され、さらに遺伝暗号のリプログラミングについて計画以上の成果を上げることができると考えられる。

2. 研究の実施状況

前年度迄に、高速進化分子工学法を開発し (TRAP display; *J. Am. Chem. Soc.* 2013)、これを応用することで、血管新生阻害剤を創製することに成功した (L1 peptide; *ACS Chem. Biol.* 2013)。本年度は、抗菌剤の創製を目指して、黄色ブドウ球菌の Type I signal peptidase SpsB を精製し、これを標的にして、高速進化分子工学法で阻害剤の創製を試みた。その結果、Type I signal peptidase SpsB の酵素活性を阻害する環状ペプチドが得られた (第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日発表)。また、この際に、標的遺伝子をクローニングする簡便な方法の開発にも成功した (MUPAC法; *BMC Biotech.* 2013)。

さらに遺伝暗号に様々なN-アルキルアミノ酸を取り込ませることを目的として、リボソームが受け入れることができる環状N-アルキルアミノ酸のスクリーニングを行った。その結果、様々な環状N-アルキルアミノ酸を用いて特殊ペプチドを合成することに成功した。さらに伸長因子Pの翻訳系への添加により、環状N-アルキルアミノ酸の取り込みが促進され、より質の高い特殊ペプチドライブラリーが調製できることが分かった (*J. Am. Chem. Soc.* 2013)。また、これまで荷電性の官能基を持つN-アルキルアミノ酸の取り込みが悪いことが問題であったが、これを解決するために、翻訳後変換法を開発した (*Chem. Sci.* 2014表紙に採用)。これらの成果により、より薬剤として適当な特殊ペプチドライブラリーの調製が可能となった。今後は、これらN-アルキル特殊ペプチドライブラリーと高速進化分子工学法と組み合わせることで、有用な薬剤候補の創製が可能になると考えられる。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 3 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kawakami, T.*; Sasaki, T; Reid, P. C.; <u>Murakami, H.*</u>, Incorporation of electrically charged N-alkyl amino acids into ribosomally synthesized peptides via post-translational conversion. <i>Chemical Science</i>, 2014, 5, 887-893. • Taniguchi, N; Nakayama, S; Kawakami, T.; <u>Murakami, H.*</u>, Patch cloning method for multiple site-directed and saturation mutagenesis. <i>BMC Biotechnology</i> 2013, 13:91. • Kawakami, T.*; Ishizawa, T.; <u>Murakami, H.*</u>, Extensive reprogramming of the genetic code for genetically encoded synthesis of highly N-alkylated polycyclic peptidomimetics. <i>Journal of the American Chemical Society</i> 2013, 135, 12297-304.
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 19 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 第 9 回 理研「バイオものづくりシンポジウム」2014 年 3 月 13 日 (和光)、招待講演 村上裕「高速進化分子工学法の開発と阻害剤創製への応用」 2. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 (神戸)、ポスター発表 溪口直弘、村上裕「黄色ブドウ球菌のシグナルペプチダーゼを標的とした抗菌剤候補の創製」 3. 第36日本分子生物学会年会 2013年12月5日 (神戸)、ポスター発表 中山紗由美、石沢堯大、村上裕 「高速試験管内進化法における抗体様タンパク質-mRNA複合体形成率の向上」 4. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 (神戸)、ポスター発表 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」 5. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, November 7th, 2013, Osaka, Poster presentation Takashi Kawakami, Takahiro Ishizawa, Hiroshi Murakami “Ribosomal incorporation of diverse cyclic N-alkyl amino acids” 6. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, November 7th, 2013, Osaka, Poster presentation Takashi Kawakami, Toru Sasaki, Patrick C. Reid, Hiroshi Murakami “Ribosomal synthesis of charged N-alkyl amino acid-containing peptides” 7. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, November 7th, 2013, Osaka, Poster presentation Takahiro Ishizawa, Takashi Kawakami and Hiroshi Murakami "High-Speed In Vitro Selection and Evolution of Functional Polypeptides Using TRAP Display" 8. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium, November 6th, 2013, Osaka, Poster presentation Tomoshige Fujino, Yuki Goto, Hiroaki Suga, Hiroshi Murakami "Incorporation of D-Amino Acids into the Peptide in the cell-free Translation System" 9. AARS2013, 9th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetase, October 7th, 2013, Hakone, Poster presentation Tomoshige Fujino, Yuki Goto, Hiroaki Suga, Hiroshi Murakami “D-amino acid compatibility with the elongation event in translation” 10. 第7回バイオ関連化学シンポジウム (日本化学会、生体機能関連化学部会) 2013年9月28日 (名古屋)、ポスター発表 藤野公茂、後藤祐樹、菅裕明、村上裕「D体アミノ酸の翻訳系への適合性に関する詳細な解析」 11. 第7回バイオ関連化学シンポジウム (日本化学会、生体機能関連化学部会) 2013年9月27日 (名古屋)、ポスター発表 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」 12. 第7回バイオ関連化学シンポジウム (生体機能関連化学部会) 2013年9月27日 (名古屋)、ポスター発表

様式19 別紙1

	<p>川上隆史、石沢堯大、藤野公茂、菅裕明、村上裕「高速試験管内分子進化法を用いた血管内皮増殖因子受容体阻害ペプチドの開発」</p> <p>13. 第86回日本生化学会大会 2013年9月12-13日（福岡）、口頭/ポスター発表 溪口直弘、村上裕「新規抗菌剤の開発を目指した黄色ブドウ球菌シグナルペプチダーゼ阻害剤の創製」</p> <p>14. 日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会 2013年6月21日（東京）、ポスター発表 川上隆史、石沢堯大、藤野公茂、Patrick C. Reid、菅裕明、村上裕「内皮細胞の血管新生を阻害する非天然型環状ペプチドの高速分子進化法による創製」</p> <p>15. 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）、ポスター発表 藤野公茂、後藤祐樹、菅裕明、村上裕「D体アミノ酸の翻訳伸長反応への適合性」</p> <p>16. 第8回日本ケミカルバイオロジー研究会 2013年6月20日（東京）、ポスター発表 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」</p> <p>17. 第13回東京大学生命科学シンポジウム 2013年6月8日（東京）、ポスター発表 溪口直弘、中山紗由美、村上裕「迅速、簡便、高効率な複数変異導入法（MUPAC法）の開発」</p> <p>18. 第13回東京大学生命科学シンポジウム 2013年6月8日（東京）、ポスター発表 藤野公茂、後藤祐樹、菅裕明、村上裕「D-amino acid compatibility with the elongation event in translation」</p> <p>19. FIRSTシンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオ、2014年2月28日（東京）、ポスター発表 村上裕「特殊ペプチド増幅法の開発と創薬への応用」</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>20. 首都の大学訪問ツアー：スーパーサイエンスハイスクール、2013年12月12日（東京）、口頭 村上裕「新規薬剤の開発」</p>
<p>図書 計1件</p>	<p>石沢堯大・川上隆史・村上裕（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” 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 担当 p389-p400 総ページ数 424 ページ, 株式会社エヌ・ティー・エス</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>（取得済み）計0件（出願中）計0件</p>
<p>Webページ （URL）</p>	
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>大学における研究活動の紹介を、香川県観音寺第一高等学校の生徒に対して行いました（首都の大学訪問ツアー、2013年12月12日、東京大学駒場Iキャンパス、参加人数 約20名）。最先端・次世代研究開発支援プログラムの内容である化合物の進化について話をしました。また、FIRSTシンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオにてポスター発表を行いました（2014年2月28日実施）。さらに、「駒場理系後期課程オープンラボ」（2013年6月7日、東京大学駒場Iキャンパス）において、研究室公開を行いました。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計) (単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	116,000,000	95,604,000	20,396,000	0	0
間接経費	34,800,000	28,681,200	6,118,800	0	0
合計	150,800,000	124,285,200	26,514,800	0	0

2. 当該年度の収支状況 (単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	2,498,800	20,396,000	0	22,894,800	22,894,800	0	0
間接経費	28,681,200	6,118,800	0	34,800,000	34,800,000	0	0
合計	31,180,000	26,514,800	0	57,694,800	57,694,800	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	12,220,665	実験試薬、実験器具、PC及び周辺消耗品等
旅費	752,800	学会(第16回生命化学研究会)にて資料収集等
謝金・人件費等	9,010,211	特任研究員、学術支援職員に係る人件費
その他	911,124	学会参加費、英文校正、実験機器修理等
直接経費計	22,894,800	
間接経費計	34,800,000	
合計	57,694,800	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
電動蛍光倒立顕微 鏡	㈱ニコン製 Ti- E-FL	1	6,778,485	6,778,485	2014/2/18	東京大学
				0		
				0		