

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 21 年度採択分

平成 24 年 5 月 28 日現在

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 (HIROAKI SUGA)

東京大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要：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。

研究分野：複合新領域

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、ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 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た。

(2) 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が確立できた。

(3) 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開発に至った。

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. これまでの成果

(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

[4. これまでの成果 (続き)]

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。

(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。今後、実験計画のさらなる改良を現在も試みている。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し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。(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、活性種探索も推進した。その他の架橋基については、現在ライブラリーの構築およびRaPIDシステムとの融合を試みている。

(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、11 に記したように多くの原著論文と総説論文で発表した。特に 2011~2012 年度に発表した E6AP(文献3)、Akt2(文献2)、SIRT2(文献1)は、いずれも高い結合活性($K_d =$ 数 nM ~ sub nM)あるいは阻害活性($IC_{50} =$ 数十 nM~数 nM)をもつ特殊ペプチドの同定に成功しており、ランドマークとして認知されるだけの十分な研究成果だと自負している。また、菅研究室独自で進めている標的に加え、共同研究により提供された標的に対する特殊ペプチド探索が多数開始されており、国内外で RaPID 技術の有用性が広く認知された。これまでに共同研究により、計4つの異なる標的蛋白質とそれぞれ特異的な結合能力をもつ特殊ペプチドとの共結晶解析が達成されている。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進行している。

5. 今後の計画

(1) 本計画については、ほぼ完了しているため、(3)へと移行する。

(2) 本計画については、脱離基をエステルからチオエステルに変更することで反応性を上げ、クライゼン縮合を試みる。PatDの研究に関しては、これまでの知見をもとに RaPID システムへの融合研究に進む。

(3)(4)については、現在の計画通りに進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

(1) J. Morimoto, Y. Hayashi, H. Suga "Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead that isoform-selectively inhibit a human deacetylase SIRT2" *Angewandte Chemie International Edition* 51, 3423-3427 (2012).

(2) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga "In Vitro Selection of Anti-Akt2 Thioether-Macrocyclic Peptides Leading to Isoform-Selective Inhibitors" *ACS Chemical Biology* 7, 607-613 (2012).

(3) Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga "Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library" *Chemistry & Biology* 18, 1562-1570 (2011).

(4) Y. Goto, T. Katoh, H. Suga "Flexizymes for genetic code reprogramming" *Nature Protocols* 6, 779-790 (2011).

(5) T.-J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga "Synthesis of a Backbone-cyclic Peptide SFTI-1 Promoted by the Induced Peptidyl-tRNA Drop-off" *Angewandte Chemie International Edition* 50, 2159-2161 (2011).

(6) T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga "Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming" *Nature Chemical Biology* 5, 888-890 (2009).

(7) Y. Goto, H. Suga "Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides" *Journal of the American Chemical Society*, 131, 5040-5041 (2009).

(8) H. Murakami, A. Ohta, H. Suga "Bases in the anticodon loop of tRNA(GGC)(Ala) prevent misreading" *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 353-358 (2009).

(9) Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami, H. Suga "Ribosomal synthesis of dehydrobutyryne- and methylanthionine-containing peptides" *Chemical Communication* 3419-3421 (2009).

他 査読付き発表論文、計 20 報

(10) 平成 23 年度内閣府産学官連携功労者表彰日本学術会議会長賞

ホームページ等

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