

BIOORGANIC CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Coordination-number control of phosphorus compounds and their complexation with metals”

Phosphorus compounds show different properties and reactivities depending on the coordination number or atomic valence. Changing the coordination mode of phosphorus moieties by external stimuli such as heat and light would result in a drastic change in their properties, which are applicable to molecular switches. We tried to control properties of the organophosphorus compounds bearing the azobenzene moiety by external stimuli. The 2-phosphinoazobenzenes are found to be in equilibria with the corresponding inner phosphonium salts in solution. The equilibria between the 2-phosphinoazobenzenes and the inner phosphonium salts are changed by various external stimuli such as heat, solvent, an acidic additive, and photoirradiation. The properties and reactivity are controlled based on the change in the equilibria. For example, the 2-phosphinoazobenzenes showed a drastic color change in response to the presence of an acid and change of the temperature.

Reactions of the 2-diphenylphosphinoazobenzenes with $ZnCl_2$, $W(CO)_5(THF)$, and $PtCl_2(cod)$ gave three different coordination types of metal complexes with distinctive UV/vis absorptions (Fig. 1). In the zinc and tungsten complexes, the source molecule works as an amide ligand and a phosphine ligand, respectively. In the platinum complex, the phosphorus molecule works as a *C,N,P*-tridentate ligand with formation of a carbon–platinum bond. The different coordination modes of the ligand in the metal complexation lead to control of the properties of the 2-diphenylphosphinoazobenzene such as UV/vis absorption. The versatile coordination modes of a single ligand will be an advantage in preparation of a metal catalyst.

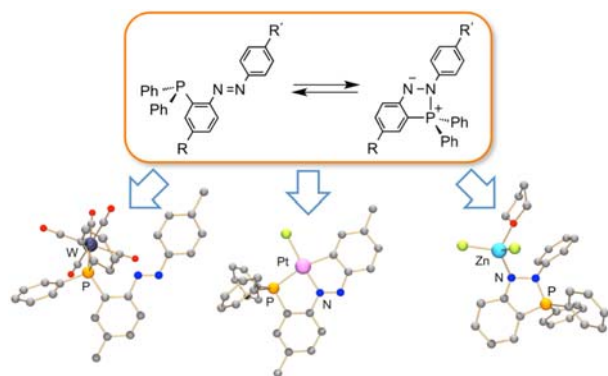


Fig. 1 The equilibria between the 2-phosphinoazobenzenes and the inner phosphonium salts, and the complexation with some metals.

1. 9) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 110 (2012).
 1. 10) *Dalton Trans.*, **41**, 11491 (2012).

(2) “Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead: isoform-selective inhibition of human deacetylase SIRT2”

Enzyme-mechanism-based drug design, where an inhibitory functional group is designed on the basis of knowledge of mechanism and embedded into an appropriate scaffold such as a native enzyme substrate, has successfully yielded inhibitors. One example of mechanism-based designed inhibitors against sirtuins is derived from a substrate peptide, $H_2N-KSTGG-K^{Ac}-APRKQ-OH$, in which the ϵ -*N*-acetyl group on the lysine residue (K^{Ac}) is replaced with ϵ -*N*-trifluoroacetyl group (K^{Tfa}). Despite this strategy has given such sirtuin inhibitors, they are not potent (IC_{50} with $>1 \mu M$) and generally not isoform-selective. We introduced the approach of enzyme-mechanism-based drug design into the RaPID system, our original macrocycles discovery platform, by constructing a library of nonstandard macrocyclic peptides that contain a K^{Tfa} residue in the middle of the sequence by using a custom-made translation apparatus that enables genetic code reprogramming, and rapidly select potent inhibitors against sirtuin 2 (SIRT2) by using the in vitro display format (Fig. 2). The nonstandard macrocyclic peptides that were identified exhibit a high inhibitory potency against SIRT2 with K_d (and IC_{50}) values in the low (single digit) nanomolar region as well as remarkable isoform selectivity. This work has demonstrated that the combination of enzyme-mechanism-based drug design and RaPID selection is a powerful strategy to obtain potent enzyme inhibitors.

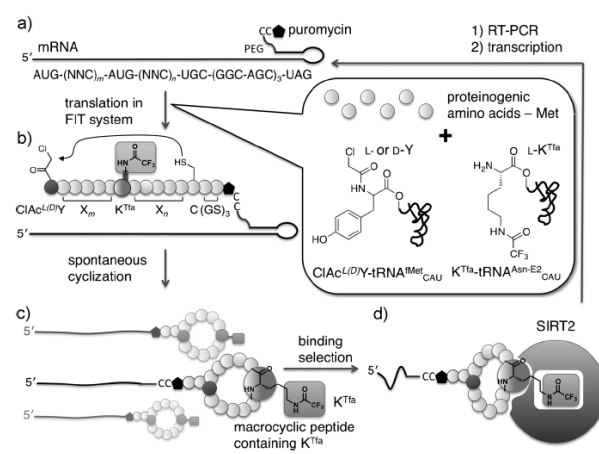


Fig. 2 Schematic illustration of the in vitro selection of SIRT2 inhibitor using a macrocyclic peptide library that contain a K^{Tfa} residue.

1. 3) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 3423 (2012).

生物有機化学研究室

研究ハイライト

(1) 有機リン化合物の配位数制御と錯形成への利用

有機リン化合物は多様な酸化数、配位数をとり、中でも第三級ホスフィンや第四級ホスホニウム塩は金属錯体の配位子として汎用され、第四級ホスホニウム塩は Wittig 反応や光延反応等の有機反応に関与している。リン化合物の反応性は配位数に依存するため、光や熱といった外部刺激によってリンの配位数を制御できれば、試剤を加えずともその反応性を制御できると期待される。そこで、光異性化するアゾベンゼンを使用して、リン化合物の性質を外部刺激で制御した。オルト位にジフェニルホスファニル基を有するアゾベンゼンの挙動を調べたところ、ホスファニル基が窒素へと求核攻撃した分子内ホスホニウム塩と (*E*)-アゾベンゼンが平衡にあることがわかった (図 1)。構造が異なる二分子間の平衡位置は、置換基、溶媒のアクセプター性、酸の添加、温度によって著しく異なる。そのため、温度変化や、酸の添加によって、溶液の色が顕著に変化した。*Z*-アゾベンゼンへと光異性化を行うと、分子内ホスホニウム塩への平衡は抑制できた。すなわち、各種条件の変化や光照射により、リンの配位数変化を自在に制御できた。

次に、2-ホスファニルアゾベンゼンを金属錯体における配位子として利用するべく、各種金属錯体との反応を行った。その結果、上記の平衡の存在を反映して、両座配位子として機能した。ハードな亜鉛錯体との反応ではアミド錯体が生成し、ソフトなタングステン錯体との反応ではホスフィン錯体が生成した。また、白金錯体との反応では C-P 結合の生成を伴い、*C,N,P*-ピンサー型錯体が生成した。このように、構造を制御できる単一の出発物質から、多様な配位様式の金属錯体を調製することができた。

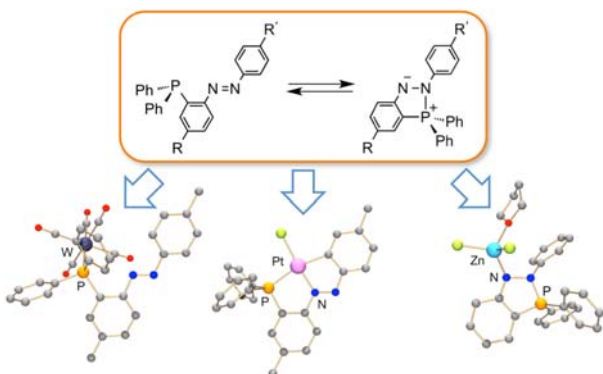


図 1 2-ホスファニルアゾベンゼンと分子内ホスホニウム塩との間の平衡と、その錯形成反応

1. 9) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 110 (2012).
1. 10) *Dalton Trans.*, **41**, 11491 (2012).

(2) SIRT2 阻害剤環状ペプチドの探索: 酵素の反応機構に基づいた結合部位の設計とペプチドへの導入

酵素の反応機構を基に活性中心に結合しうる官能基をデザインし、当該酵素の基質に導入することで酵素阻害剤を開発するアプローチは、これまでに多く実施されている。そうした阻害剤の一例としては、脱アセチル化酵素 sirtuin の基質ペプチド $H_2N-KSTGG-K^{Ac}-APRKQ-OH$ 中のアセチルリジン (K^{Ac}) の ϵ -*N*-アセチル基を、トリフルオロアセチル基 (K^{Tfa}) に置換したものが挙げられる。この戦略は効率良く阻害剤を開発できるものの、得られる阻害剤は十分な阻害能を持たない場合が多く (IC_{50} 値が数 μM 程度)、またアイソフォームの選択性を得ることは一般的に困難であった。そこで我々は、この酵素の反応機構に基づく分子デザインを、以前に開発した環状ペプチド阻害剤の大規模ライブラリー構築・探索法 (RaPID システム) に適用することとした。具体的には、遺伝暗号を改変した翻訳合成系を用いて K^{Tfa} 残基を有する環状ペプチドの大規模ライブラリーを構築し、その中から mRNA ディスプレイ法を用いて sirtuin 2 (SIRT2) に結合するペプチドを探索した (図 2)。取得された環状ペプチドは SIRT2 に対する強い結合力と阻害効果を示しており、 K_d 値、 IC_{50} 値は 1 桁 nM のオーダーであった。一方で、SIRT1 や SIRT3 に対する阻害効果は低く、高いアイソフォーム選択性を示した。この成果は、酵素の反応機構に基づく分子デザインと RaPID システムの融合利用が、強力な酵素阻害剤を簡便に開発する上で強力な手法となることを示している。

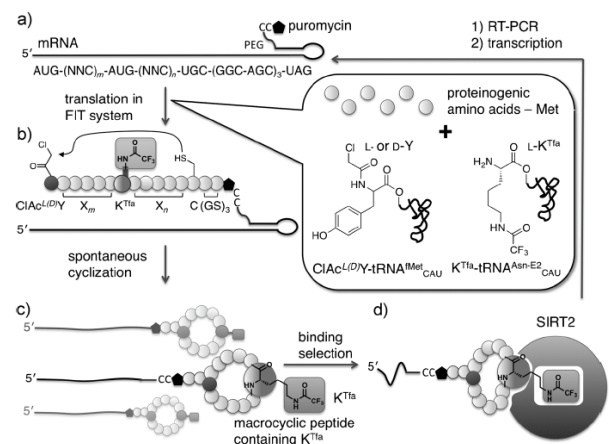


図 2 ϵ -*N*-トリフルオロアセチルリジンを含む大環状ペプチドライブラリーを用いた SIRT2 阻害剤ペプチドの *in vitro* セレクション

1. 3) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 3423 (2012).

1. 原著論文

- 1) C.J. Hipolito, H. Suga, "Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: the FIT and RaPID systems", *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, **16**, 196-203 (2012)
- 2) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga, "Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation", *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 5783-5786 (2012)
- 3) J. Morimoto, Y. Hayashi, H. Suga, "Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead: isoform-selective inhibition of human deacetylase SIRT2", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 3423-3427 (2012)
- 4) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga, "In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors", *ACS Chem. Biol.*, **7**, 607-613 (2012)
- 5) Y. Goto, H. Suga, "Flexizymes as a tRNA acylation tool facilitating genetic code reprogramming", *Methods in Molecul. Biol.*, **848**, 465-478 (2012)
- 6) P.C. Reid, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga, "Charging of tRNAs using ribozymes and selection of cyclic peptides containing thioethers", *Methods in Mol. Biol.*, **805**, 335-348 (2012)
- 7) K.B. Lee, H.C. Kim, D.M. Kim, T.J. Kang, H. Suga, "Comparative evaluation of two cell-free protein synthesis systems derived from Escherichia coli for genetic code reprogramming", *J. Biotechnol.*, **164**, 330-335 (2012)
- 8) H. Chai, M. Hazawa, Y. Hosokawa, J. Igarashi, H. Suga, I. Kashiwakura, "Novel acridine-based N-acyl-homoserine lactone analogs induce endoreduplication in the human oral squamous carcinoma cell line SAS.", *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1257-1263 (2012)
- 9) M. Yamamura, N. Kano and T. Kawashima, "Control of the Equilibrium between 2-Phosphinoazobenzenes and Inner Phosphonium Salts by Heat, Solvent, Acid, and Photoirradiation", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **85**, 110-123 (2012).
- 10) N. Kano, M. Yamamura, X. Meng, T. Yasuzuka, and T. Kawashima, "Different Coordination Modes of 2-(Diphenylphosphino)azobenzenes in Complexation with Hard and Soft Metals", *Dalton Trans.*, **41**, 11491-11496 (2012).
- 11) H. Itoi, T. Kambe, N. Kano and T. Kawashima, "Properties of Fluorescent 2-Borylazobenzenes Bearing an Ionic Moiety", *Inorg. Chim. Acta*, **381**, 117-123 (2012).
- 12) N. Kano, A. Furuta, T. Kambe, J. Yoshino, Y. Shibata, T. Kawashima, N. Mizorogi and S. Nagase, "2,2'-Diborylazobenzenes with Double N-B Coordination: Control of Fluorescent Properties by Substituents and Redox Reactions", *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1584-1587 (2012).
- 13) N. Kano, K. Yanaizumi, X. Meng, and T. Kawashima, "Control of Reactivity of Phosphine Imides by Intramolecular Coordination with an Organoboryl Group", *Heteroat. Chem.*, **23**, 429-434 (2012).
- 14) N. Kano, N. Yoshinari, Y. Shibata, M. Miyachi, T. Kawashima, M. Enomoto, A. Okazawa, N. Kojima, J.-D. Guo and S. Nagase, "Anionic Iron Complexes with a Bond between an Ate-Type Pentacoordinated Germanium and an Iron Atom", *Organometallics*, **31**, 8059-8062 (2012).

2. 総説・解説

- 1) 伊藤健一郎・菅裕明 「RaPID システムが創る特殊環状ペプチド創薬」 *実験医学増刊*, **30**, 1191-1197 (2012).
- 2) 高辻諒・伊藤健一郎・菅裕明 「特殊ペプチドの新規合成法と探索法: RaPID システム」 *ペプチド医薬の最前線*, 36-40 (2012).
- 3) 小嶋達矢・林 勇樹・菅 裕明 「遺伝暗号リプログラミング技術」 *生物物理*, **52**, 4-9 (2012).
- 4) 狩野直和 「炭素とは違うケイ素の結合」 *化学と教育*, **60**, 110-111 (2012).
- 5) 狩野直和 「反発し合う二つの原子をつなげる」 *Ohm Bulletin*, **48**, 2-4 (2012).