

BIOORGANIC CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) “Development of macrocyclic peptide that inhibits the function of a MATE family transporter and serves as a cocrystallization ligand”

MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) transporters are membrane proteins that consist of five families and are involved in export of various xenobiotics out of the cell depending on electrochemical gradient of H^+ or Na^+ across the cell membrane. Unfortunately, beneficial drug molecules such as anti-cancer drugs and antibiotics against bacteria can also be recognized as targets of MATE-driven export, which leads to loss of medicinal effects of such drugs. Therefore, development of MATE inhibitors has been much expected in the pharmaceutical industry for a long time.

Previously, our laboratory has developed a powerful method, named RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) system, which enables high throughput screening of non-standard macrocyclic peptides that specifically bind to target proteins. By using this technology, we have successfully obtained several macrocyclic peptides that specifically bind to a MATE family protein, PfMATE derived from a thermophilic archaea, *Pyrococcus furiosus*. Inhibitory activities of these macrocyclic peptides against PfMATE were also confirmed. Moreover, we could use these peptides as cocrystallization ligands that can stabilize the structure of PfMATE, and succeeded in elucidation of the mechanism of PfMATE-driven transport and inhibition of the transport by the peptides based on the cocrystal structure.

1.(1)-1) *Nature*, **496**, 247 (2013).

1.(1)-2) *Molecules*, **18**, 10514 (2013).

(2) “Nonstandard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons”

In the genetic code, each codon generally is assigned to a single kind of amino acid or termination. However, AUG exceptionally corresponds to two amino acids, formylmethionine and methionine, for initiation and elongation, respectively. We have expanded the “dual sense” assignment ability of AUG codon to create multiple engineered codons, which drastically increased the variety of non-proteinogenic amino acids used in a translation system. This report demonstrated that various triplets besides AUG could function as noncanonical start codons and also as reprogrammed elongation codons, *i.e.*, they are “dual sense” codons, simultaneously assigning two distinct artificial amino acids in initiation and elongation. Importantly, the dual sense codons are highly orthogonal, *i.e.*, they are correctly decoded with the designated amino acids without cross-readings. This engineered translation using multiple artificial initiators and elongators is in sharp contrast to former systems in

which the initiator had been limited to one kind of amino acids. This study have clearly showed that the classical adaptor hypothesis, which highlights the importance of codon–anticodon interactions in accurate mRNA decoding, can be extended to both initiation and elongation events under a genetic code with reprogrammed dual sense codons. In addition, this methodology can expand the repertoire of initiators and structural diversity of peptides simultaneously synthesized in one translation mixture. Thus, such an expression system can be applied for the discovery of bioactive non-standard peptides using DNA-encoded non-standard peptide libraries.

1.(1)-3) *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2630 (2013).

(3) “Water-driven reduction of a phosphine imide”

Hydrosilanes, R_3Si-H , are useful for hydrosilylation of multiple bonds, reduction of various functional groups, and preparation of a silanol by hydrolysis. Phosphine imides, $R_3P=NR'$, are popular for its use in the Staudinger reaction and aza-Wittig reaction, and they are hydrolyzed to give phosphine oxides. In this study, a compound bearing both a hydrosilane moiety and a phosphine imide moiety was synthesized to reveal their cooperative effects on the reactivities. The hydrosilane showed a weak intramolecular interaction between a silicon atom and a nitrogen atom of the phosphine imide moiety both in solution and in crystals. Addition of water converted the hydrosilane and phosphine imide moieties to a silanol and a phosphine, respectively (Fig. 1). A phosphine oxide, which is a usual hydrolysis product of phosphine imides, was not generated at all. Study on reaction mechanism revealed that a key step of this reaction was the intramolecular hydride migration from the silicon atom to the phosphorus atom. This result suggests that appropriate molecular design using two different functional groups enables cooperative effects on their reactivities toward water.

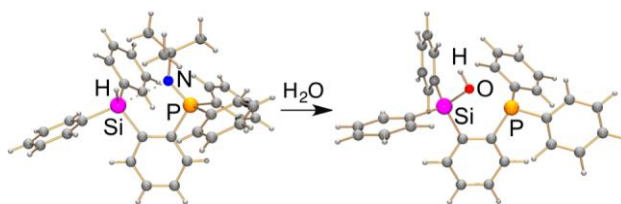


Fig. 1 Water-driven reduction of phosphine imide.

1.(1)-6) *Chem. Commun.*, **49**, 10373 (2013).

生物有機化学研究室

研究ハイライト

(1) 多剤排出輸送体MATEに結合する特殊環状ペプチド阻害剤の開発とMATEの結晶構造解析

多剤排出輸送体 MATE (Multidrug and toxic compound extrusion) は様々な毒物を細胞外に排出する機能を持つ膜輸送体タンパク質である。MATE は5種類のファミリーから構成されており、細胞内外の H^+ イオンや Na^+ イオン濃度の勾配を利用して、細胞内の異物を細胞外へと排出する。病原生物に対する抗生物質や、がん細胞に対する抗がん剤なども MATE によって異物と見なされて排出されてしまうため、MATE の輸送機能を阻害する薬剤の開発や輸送メカニズムの詳細な解明が待望されている。

当研究室ではこれまでに標的タンパク質に特異的に結合する特殊環状ペプチドの迅速なスクリーニング手法として RaPID システム (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) の開発を行っており、今回この手法を用いて好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の PfMATE に特異的に結合する特殊環状ペプチドを取得し、PfMATE の輸送機能を阻害することに成功した。また、得られたペプチドを PfMATE の構造を安定化させるためのリガンドとして用いて PfMATE との共結晶構造解析を行い、PfMATE の輸送メカニズムやペプチドによる阻害様式を明らかにした。

1.(1)-1) *Nature*, **496**, 247 (2013).

1.(1)-2) *Molecules*, **18**, 10514 (2013).

(2) 二重にリプログラムされたコドンを含む人工遺伝暗号を用いた特殊ペプチドの翻訳合成

普遍遺伝暗号において、それぞれのコドンは通常一種類のアミノ酸もしくは翻訳停止に対応付けされている。しかしながら、AUG コドンだけは例外的に、開始反応ではホルミルメチオニンを、伸長反応ではメチオニンを指定している。我々は、AUG コドンに見られる二重アミノ酸指定現象を、他の複数のコドンに人工に適用することで、単一の翻訳反応で利用可能な非天然アミノ酸のバリエーションを飛躍的に増やすことに成功した。この研究では、AUG 以外の種々のコドンが、非天然型の開始コドンとして機能するだけでなく、同時にリプログラムされた伸長コドンとしても利用できることを明らかにした。つまり、これらのコドンは開始反応と伸長反応で異なる二つのアミノ酸を指定しうる、「二重にリプログラムされたコドン」と言える。また、これらのコドンは互いに混同されず、高い直交性を示した。この人工遺伝暗号を用いた翻訳系では、複数の人工開始残基及び人工アミノ酸を同時に利用できる点で、既存の

翻訳系とは大きく一線を画す。

本研究は、正確な遺伝子解読におけるコドン-アンチコドン対合の重要性を述べた、古典的なアダプター仮説が、二重にリプログラムされた開始コドン及び伸長コドンにも適用できることを示している。さらに本手法は、翻訳系で同時利用可能な人工開始残基の数と構造多様性を拡大することに成功しており、生物活性特殊ペプチドの発見に向けたペプチドライブラリ構築に今後活用されることが期待される。

1.(1)-3) *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2630 (2013).

(3) 水の添加で起こる有機リン化合物の還元反応

ケイ素-水素結合を有する有機ケイ素化合物であるヒドロシランは、多重結合のヒドロシリル化反応、多様な官能基の還元反応、加水分解反応によるシラノールの調製等に使用される有用な化合物である。一方、ホスフィンイミドは Staudinger 反応や aza-Wittig 反応に使用され、加水分解されるとホスフィンオキシドへ変換される。本研究では二つの官能基の協働作用について知見を得るため、ホスフィンイミドとヒドロシランを一つの分子内に組み込んだ化合物を合成した。分子構造を調べたところ、結晶中でも溶液中でも窒素-ケイ素間に弱い分子内相互作用があることが明らかとなった。このヒドロシランに水を添加すると、ケイ素部位はシラノールへ変換されたが、ホスフィンオキシドの生成はまったく見られず、その代わりにホスフィンイミド部位はホスフィンへと還元された (図1)。反応機構に関する検討の結果、水の添加に応答して活性化されたケイ素上の水素がリン上へ分子内転位する過程を鍵として反応が進行することがわかった。この結果は、適切な分子設計を施すことで、リンとケイ素の協働作用が水の添加を契機として起こることを示している。

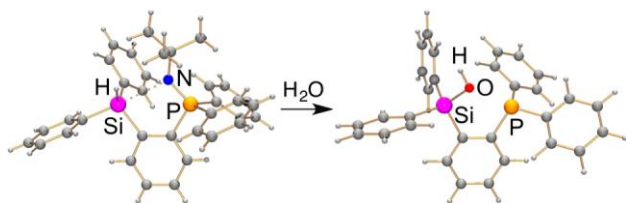


図1 水の添加によるリン官能基の還元反応

1.(1)-6) *Chem. Commun.*, **49**, 10373 (2013).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) 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*, **496**, 247-251 (2013).
- 2) 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*, **18**, 10514-10530 (2013)
- 3) Y. Goto, M. Iseki, A. Hitomi, H. Murakami, H. Suga, “Nonstandard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons”, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 2630-2634 (2013).
- 4) 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 Macrocyclic Peptides That Antagonize VEGFR2 Activity in Living Cells”, *ACS Chem. Biol.*, **8**, 1205-1214 (2013).
- 5) T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami, “Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation”, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 1830-1837 (2013).
- 6) N. Kano, K. Yanaizumi, X. Meng, N. Havare, T. Kawashima, “Synthesis of a Phosphine Imide Bearing a Hydrosilane Moiety, and Its Water-Driven Reduction to a Phosphine”, *Chem. Commun.*, **49**, 10373-10375 (2013).
- 7) J. Yoshino, N. Kano, T. Kawashima, “Fluorescent Azobenzenes and Aromatic Aldimines Featuring an N–B Interaction”, *Dalton Trans.*, **42**, 15826-15834 (2013).

(2) その他

- 1) Y. Goto, S. Tsunoda, Y. Kato, Y. Ito, H. Suga, “PatD–FIT system: A versatile synthetic tool for azoline-containing peptides”, *Peptide Science*, **50**, 89-90 (2013).
- 2) T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami, “Incorporation of D-amino acids into peptides in a cell-free translation system”, *Peptide Science*, **50**, 167-168 (2013).

2. 総説・解説

- 1) T. Passioura, H. Suga, “Flexizyme-mediated genetic reprogramming as a tool for noncanonical Peptide synthesis and drug discovery”, *Chemistry*, **19**, 6530-6536 (2013)
- 2) 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*, **18**, 3502-3528 (2013)
- 3) 後藤佑樹, “コドンのランダム化による新規チオペプチド誘導体の探索”, 「日本ケミカルバイオロジー学会 学会機関誌」(2013)
- 4) 後藤佑樹, “PatD-FIT システム : アズリンペプチドの汎用人工生合成系”, 「日本化学会生体機能関連化学部会ニュースレター」 **28**, 6-9 (2013)

3. 著書

- 1) T. Passioura, H. Suga, “Flexizymes, Their Evolutionary History and Diverse Utilities”, *Topics in Current Chemistry* (2013).
- 2) 加藤敬行, 後藤佑樹, 菅裕明, “翻訳系リモデリング”, 「生命システム工学」, 71-100 (2013).
- 3) 岩根由彦, 高辻諒, 加藤敬行, 菅裕明, “RNA ワールドの実験的検証”, 「進化分子工学の最前線」, 49-60 (2013).
- 4) 西尾洗祐, 石橋正成, 後藤佑樹, 菅裕明, “人工特殊ペプチドの創製”, 「進化分子工学の最前線」, 411-424 (2013).

- 5) 狩野直和, 川島隆幸, “高配位ケイ素化合物の結合”, 「現代ケイ素化学 体系的な基礎概念と応用に向けて」, 吉良満夫, 玉尾皓平編, 化学同人 (2013), pp. 53-64.
- 6) 狩野直和, 川島隆幸, “高配位ケイ素化合物”, 「現代ケイ素化学 体系的な基礎概念と応用に向けて」, 吉良満夫, 玉尾皓平編, 化学同人 (2013), pp. 187-201.

4. その他

- 1) 菅裕明, 後藤佑樹, 角田翔太郎 「ヘテロ環を含む化合物の製造方法」特願 2013-45888.
- 2) 菅裕明「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」特願 2013-174906.
- 3) 菅裕明, 野地博行, 藤田大士, 渡邊力也 「高密度微小チャンバーアレイおよびその製造方法」特願 2013-171493.
- 4) 菅裕明, 伊藤健一郎 「c-Met タンパク質アゴニスト」特願 2013-214771.
- 5) 後藤佑樹, “日々是非日常”, 「日本 RNA 学会会報」, **28**, 21-22 (2013).
- 6) 後藤佑樹, “はじめての論文”, 「東京大学新聞」, **2643**, 3 (2013).