BIOORGANIC CHEMISTRY

Annual Research Highlights

(1) "Activation of Met signaling pathway by means of dimeric macrocyclic peptides"

Met is a trans-membrane protein that possesses a tyrosine kinase activity. On binding to hepatocyte growth factor (HGF), Met induces trans-autophosphorylation and regulates various signaling pathways together with downstream kinases such as Akt and Erk. Biological responses triggered by the Met activation and the downstream signaling lead to wound healing of tissues. Here, we developed artificial Met-activating macrocyclic peptides. First, we identified Met-binding monomeric macrocyclic peptides by using the RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) system, and dimerized the monomers to induce dimerization of two Met molecules on the cell membrane (Fig. 1). Various HGF-like cellular responses, such as branching morphogenesis, were induced in human cells by the macrocycles. This work suggests that our approach to generate dimeric macrocycles as non-protein ligands for cell surface receptors can be a powerful method for developing potential therapeutics.

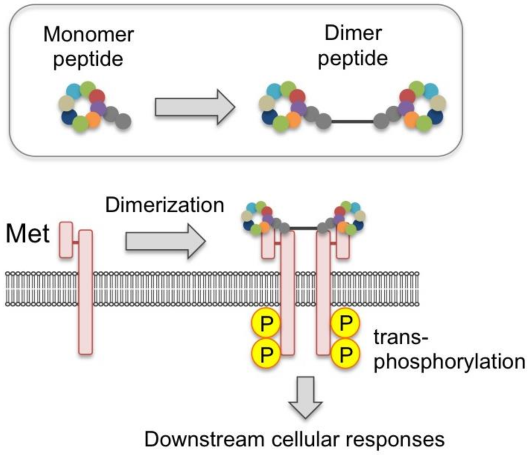

Fig. 1 Met activation by dimeric Met-binding peptide initiates downstream cellular responses.

1.(1)-1) *Nat. Commun.*, **6**, 6373 (2015).

(2) "Development of a fluorescent imaging probe for detecting cellular EpCAM based on a macrocyclic scaffold"

EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) is a transmembrane glycoprotein expressed on various carcinoma cells such as breast, prostate, ovarian, lung, colon, renal, and gastric cancer, indicating the importance of EpCAM as a diagnostic biomarker for these cancers. Here, we developed a new fluorescent probe based on a macrocyclic peptide scaffold that specifically visualizes EpCAM-expressing MCF7 cells. By using the RaPID system, a macrocyclic peptide named Epi-1-F binding to the extracellular domain of EpCAM was discovered (Fig. 2). The dissociation constant is in the low nM range (1.7 nM). Due to the low molecular size (less than 3,000 Da), Epi-1-F with a fluorescence tag could successfully stain live cells under high cell-density conditions, which could not be achieved by the conventional antibody-based staining method. This result suggests that the macrocyclic peptide has a great potential as a new diagnostic probe for detection of EpCAM expression.

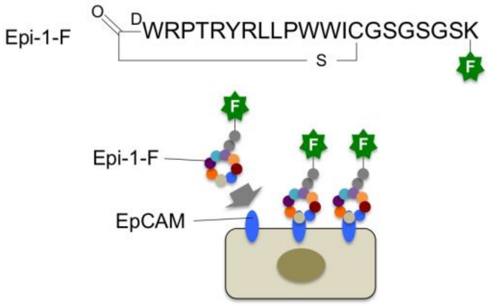

Fig. 2 Imaging of EpCAM on living cells by fluorescent labeled Epi-1-F.

1.(1)-2) *J. Mol. Evol.*, **81**, 210-217 (2015).

(3) "Synthesis of 2,2′-disilylazobenzenes: a photoisomerizable fluorophore"

Azobenzene, which is the fundamental core of azo dyes, isomerizes reversibly between the (*E*)- and (*Z*)-isomers upon photoirradiation. The property impedes fluorescence emission, which is another property of some dyes. There are only a few azobenzenes that undergo both photoisomerization and measurable fluorescence emission. Here, (*E*)-2,2′-disilylazobenzenes featuring twofold weak nitrogen···silicon interactions were synthesized. The lowest singlet excitation energy state of one of the azobenzenes was found to be the allowed π,π* transition. It fluoresced a yellow-green color at room temperature and underwent photoisomerization to the non-fluorescent (*Z*)-isomers. This change in the fluorescence property upon photoisomerization would be useful to regulate the fluorescence intensity using a single light source.

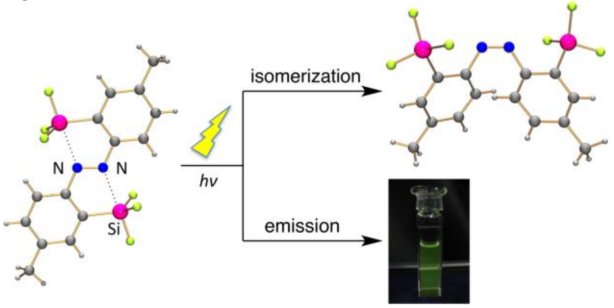

Fig. 3 Photochemical behavior of a bis-silylated azobenzene.

1.(1)-7) *Dalton Trans.*, **44**, 16256-16265 (2015).

生物有機化学研究室

研究ハイライト

(1) 二量体化環状ペプチドによる Met シグナル経路の活性化

Met は細胞表面に存在するチロシンキナーゼの一種で、リガンドである HGF (Hepatocyte growth factor) が結合することによって二量体化し、自己トランスリン酸化する。これにより、さらに下流の Akt や Erk などのリン酸化を介して様々なシグナルの伝達を誘発する。Met によるこれらの経路の活性化は、細胞のダメージの修復に役立つと考えられている。そこで、今回我々は Met の二量体化を促進するようなペプチド医薬の開発を試みた。まず、Met に結合するモノマー環状ペプチドを RaPID システム(Random non-standard Peptide Integrated Discovery)により取得し、これを二量体化したペプチドをヒト培養細胞に投与したところ（図 1）、HGF 応答時に見られる分岐形態形成と同様の変化が見られた。この結果は、我々の手法が細胞表面のレセプターに対する非タンパク質性リガンドを開発するための新しい手法として有効であることを示すものである。

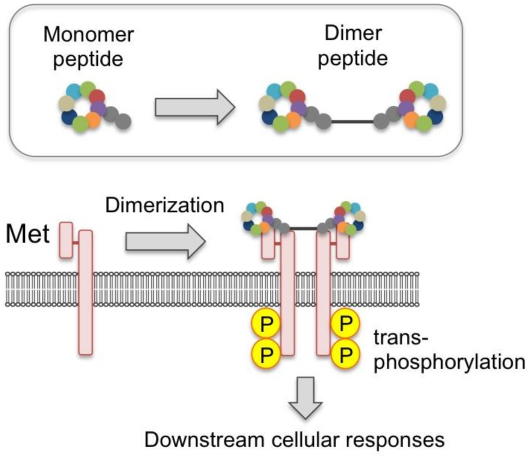

図 1　二量体化特殊環状ペプチドによる Met の活性化

1.(1)-1) *Nat. Commun.*, **6**, 6373 (2015).

(2) 蛍光ラベル特殊環状ペプチドを用いた細胞表面 EpCAM のイメージング

EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)は細胞膜上に発現する糖タンパク質の一種であり、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、肺癌、結腸腺癌、腎臓癌、胃癌など様々な癌細胞において過剰発現している。そのため、EpCAM はこれらの癌の診断マーカーとして有用であると考えられる。そこで我々は EpCAM を発現している MCF7 細胞を選択的に可視化することが可能な特殊環状ペプチドの開発をおこなった。RaPID システムを用いて得られた環状ペプチド Epi-1-F（図２）は、EpCAM の細胞外ドメインに対して解離定数 1.7 nM の強さで結合することが確認された。その分子サイズの小ささから、Epi-1-F は密集状態の細胞間隙に浸透し染色できることが示されたが、これは分子サイズの大きな抗体による染色では達成し得なかったことである。この結果は、我々の環状ペプチドが EpCAM の発現解析のための新しい診断プローブとして非常に有効であることを示唆している。

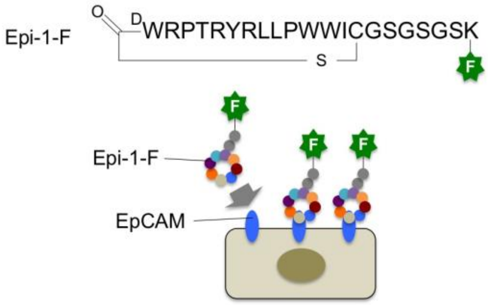

図 2　蛍光ラベルした環状ペプチド Epi-1-F による EpCAM のイメージング

1.(1)-2) *J. Mol. Evol.*, **81**, 210-217 (2015).

(3) 光異性化する蛍光性アゾベンゼンの開発

アゾ染料の基本骨格であるアゾベンゼンが光異性化を起こすことはよく知られているが、その特性は蛍光発光の特性発現の妨げとなる。そのため、蛍光発光と光異性化の両方の特性をもつアゾベンゼンは、ほとんど知られていない。今回、二つのケイ素置換基をアゾ基の近傍に導入したアゾベンゼンを合成した。比較的弱い分子内ケイ素−窒素相互作用が生じた結果、基底状態から最低励起一重項状態への遷移は、許容遷移である π,π *遷移となることがわかった。室温での光照射条件下において、ケイ素置換アゾベンゼンの蛍光発光と光異性化の両方の現象が観測された。(*E*)体から(*Z*)体への光異性化後は蛍光を発しなかった。このような光化学特性の変化は、単一光源による発光制御の可能性を示唆するものである。

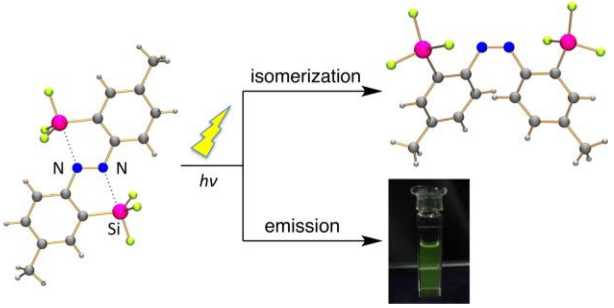

図 3　ケイ素置換されたアゾベンゼンの光照射下での挙動

1.(1)-7) *Dalton Trans.*, **44**, 16256-16265 (2015).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

1) K. Ito, K. Sakai, Y. Suzuki, N. Ozawa, T. Hatta, T. Natsume, K. Matsumoto, H. Suga, "Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds", *Nat. Commun.*, **6**, 6373 (2015).
2) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, T. Yamashita, S. Kaneko, H. Suga, "A Fluorescent Imaging Probe Based on a Macrocyclic Scaffold That Binds to Cellular EpCAM", *J. Mol. Evol.*, **81**, 210 (2015).
3) N.K. Bashiruddin, M. Nagano, H. Suga, "Synthesis of fused tricyclic peptides using a reprogrammed translation system and chemical modification", *Bioorg. Chem.*, **61**, 45 (2015).
4) Z. Liu, O. Vargas-Rodriguez, Y. Goto, E.M. Novoa, L. Ribas de Pouplana, H. Suga, K. Musier-Forsyth, "Homologous trans-editing factors with broad tRNA specificity prevent mistranslation caused by serine/threonine misactivation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 6027 (2015).
5) E.M. Novoa, O. Vargas-Rodriguez, S. Lange, Y. Goto, H. Suga, K. Musier-Forsyth, L. Ribas de Pouplana, "Ancestral AlaX editing enzymes for control of genetic code fidelity are not tRNA-specific", *J. Biol. Chem.*, **290**, 10495 (2015).
6) N. Bayo-Puxan, R. Rodriguez-Mias, M. Goldflam, M. Kotev, S. Ciudad, C.J. Hipolito, M. Varese, H. Suga, R. Campos-Olivas, X. Barril, *et al.*, "Combined Use of Oligopeptides, Fragment Libraries, and Natural Compounds: A Comprehensive Approach To Sample the Druggability of Vascular Endothelial Growth Factor", *ChemMedChem*, **11**, 928 (2016).
7) N. Kano, M. Yamamura, and T. Kawashima, "2,2′-Disilylazobenzenes Featuring Double Intramolecular Nitrogen⋯Silicon Coordination: A Photoisomerizable Fluorophore ", *Dalton Trans.*, **44**, 16256-16265 (2015).
8) N. Kano, S. Tsukada, Y. Shibata, T. Kawashima, H. Sato, J.-D. Guo, and S. Nagase, "Interconversion among Dianionic, Anionic, and Neutral Compounds Bearing a Bond between Two Pentacoordinated Germanium Atoms", *Organometallics*, **34**, 56-62 (2015).
9) N. Kano, H. Miyake, K. Sasaki, and T. Kawashima, "Oxidative Bond Cleavage of the Silicon–Silicon Bond of a Pentacoordinated Disilicate", *Heteroat. Chem.*, **26**, 183-186 (2015).

(2) その他

1) Y. Kato, Y. Goto, H. Suga, “Laser-induced oxidation of a peptide-embedded thiazoline by an assistance of adjacent thiazoline”, *Peptide Science*, **52**, 27-8 (2015).
2) M. Nagano, N.K. Bashiruddin, H. Suga, “Regioselective synthesis of fused-tricyclic peptides by post-translational chemical modification”, *Peptide Science*, **52**, 115-6 (2015).
3) T. Morioka, K. Ito, H. Suga, “Exploration of dual-binding peptides to human and mouse Met”, *Peptide Science*, **52**, 199-200 (2015).
4) X. Song, H. Suga, “Macrocyclic peptide inhibitors for the interaction between Ebola virus protein VP24 and karyopherin alpha (KPNA) nuclear transporter”, *Peptide Science*, **52**, 343-4 (2015).
5) H. Yu, P. Dranchak, J. Inglese, H. Suga, “Potent macrocyclic peptide inhibitors against cofactor-independent phosphoglycerate mutase”, *Peptide Science*, **52**, 345-6 (2015).

2. 総説・解説

1) T. Morioka, N.D. Loik, C.J. Hipolito, Y. Goto, H. Suga, "Selection-based discovery of macrocyclic peptides for the next generation therapeutics", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **26**, 34 (2015).
2) N.K. Bashiruddin, H. Suga, "Construction and screening of vast libraries of natural product-like macrocyclic peptides using in vitro display technologies", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **24**, 131 (2015).
3) N. Terasaka, Y. Iwane, A.S. Geiermann, Y. Goto, H. Suga, "Recent developments of engineered translational machineries for the incorporation of non-canonical amino acids into polypeptides", *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 6513 (2015).
4) J.M. Rogers, H. Suga, "Discovering functional, non-proteinogenic amino acid containing, peptides using genetic code reprogramming", *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 9353 (2015).
5) 後藤佑樹, “注目の論文:天然抗菌ペプチドの生合成機構を解明”,「化学」, 株式会社化学同人, **70**, 62-3 (2015).

3. 著書

1) 狩野直和, 佐藤守俊 訳, 「トロウ化学入門」, Nivaldo Tro 著, 東京化学同人 (2015).

2) 狩野直和, “化学：基礎を身につけてこそ楽しめる”, 「東大（2016）CHANGE 東大」, 東京大学新聞社, pp. 58–59 (2015).

4. その他

1) 菅裕明, 後藤佑樹, 加藤保治 「アゾール誘電体骨格を有するペプチドの製造方法」特許：PCT/JP2015/052961.
2) 菅裕明, 山岸祐介「Ｎ－メチルアミノ酸およびその他の特殊アミノ酸を含む特殊ペプチド化合物ライブラリーの翻訳構築と活性種探索法」特許：第 05818237 号.
3) 菅裕明, 村上裕, 後藤佑樹「新規人工翻訳合成系」特許：特許第 05725467 号.