

Annual Research Highlights

(1) “Macrocytic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor”

Hepatocyte growth factor (HGF) is an extracellularly secreted protein that promotes tissue growth and regeneration by binding to its receptor protein cMET. However, when HGF acts on various cancer tissues, it is known to promote cancer metastasis and resistance to anticancer drugs. Development of molecules that inhibit HGF-MET binding has been required.

In this study, we developed a cyclic peptide (Hip-8) that binds to HGF using the Random Integrated Peptides Discovery (RaPID) system. Hip-8 binds specifically to active HGF and inhibits its interaction with cMET (Fig. 1). High-speed atomic force microscopy (HS-AFM) revealed that Hip-8 strongly inhibits the conformational dynamics of HGF. Furthermore, radioisotope (^{64}Cu)-labeled Hip-8 was intravenously administered to mice transplanted with human lung cancer tissues and performed positron emission tomography (PET) imaging analysis, which revealed that Hip-8 selectively accumulated in cancer tissues expressing HGFs. This result indicates that Hip-8 is useful as a PET probe for cancer imaging. Furthermore, it is expected to be applied as an active HGF-selective anticancer agent.

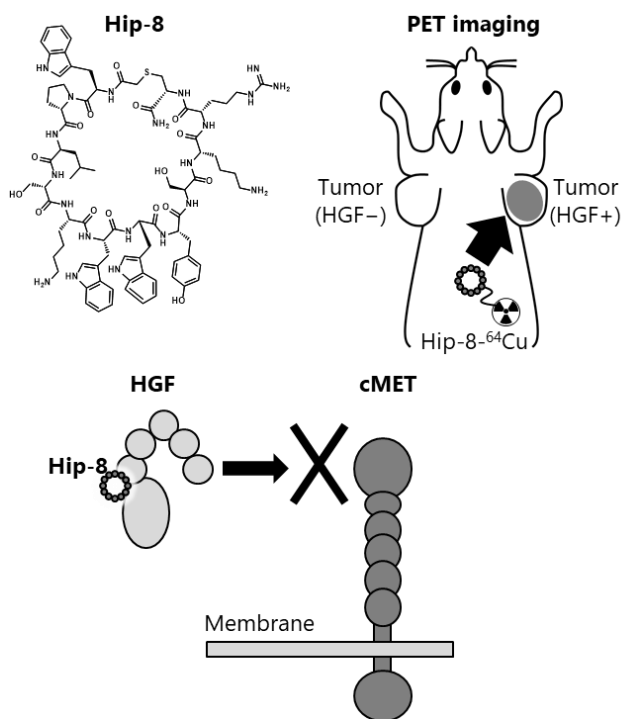


Fig. 1 Chemical structure of Hip-8. Illustration of PET imaging by Hip8- ^{64}Cu , and inhibition of HGF-cMET interaction by Hip-8.

1.(1)-8) *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 598-606 (2019)

(2) “Chemoenzymatic Posttranslational Modification Reactions for the Synthesis of $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ -Containing Peptides”

The $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ reduced amide bond is a peptide isostere widely used in the development of bioactive pseudopeptides. In this study, we have devised a method of chemoenzymatic posttranslational modification for the synthesis of $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ -containing peptides converted from ribosomally expressed peptides. The posttranslational conversion composed of an enzymatic cyclodehydration and facile two-step chemical reduction achieves deoxygenation of a specific amide bond present in a nonprotected peptide in water. This method generates the $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ bond in peptides and is applicable to various peptide sequences, potentially enabling the preparation of a library of $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ -containing peptides.

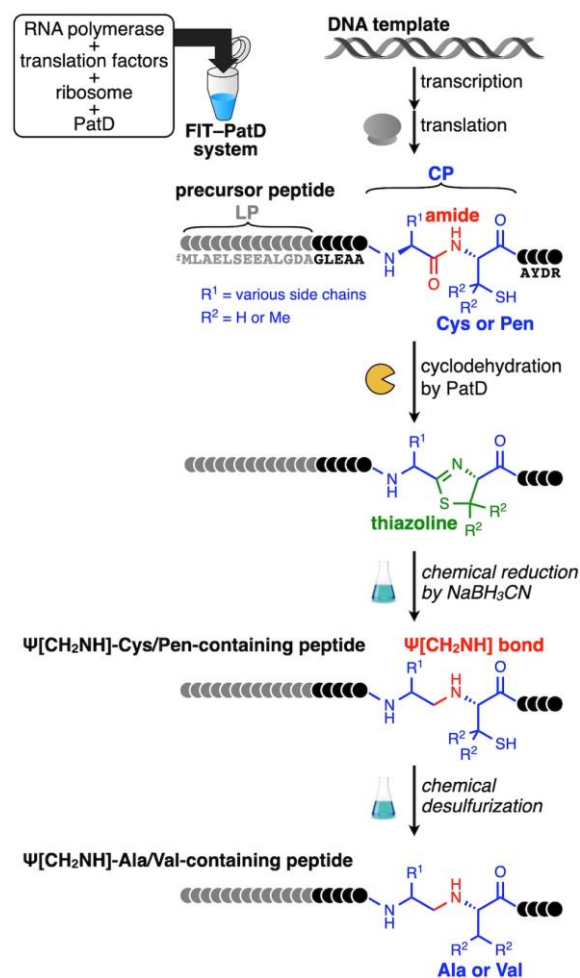


Fig. 2 Schematic illustration of the chemoenzymatic posttranslational modification reactions for the synthesis of $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ -containing peptides.

1.(1)-3) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **59**, 684-688 (2019)

研究ハイライト

(1) 肝細胞増殖因子を阻害し、PET イメージングに応用可能な環状ペプチドの開発

肝細胞増殖因子(HGF)は細胞外に分泌されるタンパク質であり、その受容体タンパク質 cMET と結合することで、組織の成長・再生を促す。ところが様々ながん組織において、HGF が作用すると、がんの転移や抗がん剤に対する耐性獲得を促進することが知られている。そのため、HGF-MET の結合を阻害する分子の開発が求められている。

本研究では Random Integrated Peptides Discovery(RaPID)法を用いて、HGF に結合する環状ペプチド (Hip-8) を開発した。Hip-8 は活性型 HGF 特異的に結合し、cMET との相互作用を阻害する (図 1)。高速原子力間力顕微鏡(HS-AFM)によって、Hip-8 は HGF のダイナミックな形状変化を強く阻害していることが明らかになった。さらにヒト肺がん組織を移植したマウスに放射性同位元素 (^{64}Cu) で標識した Hip-8 を投与し、PET (ポジトロン断層法) によるイメージング解析を行い、Hip-8 は活性型 HGF が豊富ながん組織に選択的に集積することを明らかにした。

本結果は Hip-8 はがん画像診断のための PET プロブとして有用であることを示す。さらに活性型 HGF 選択的な抗がん剤としての応用が期待される。

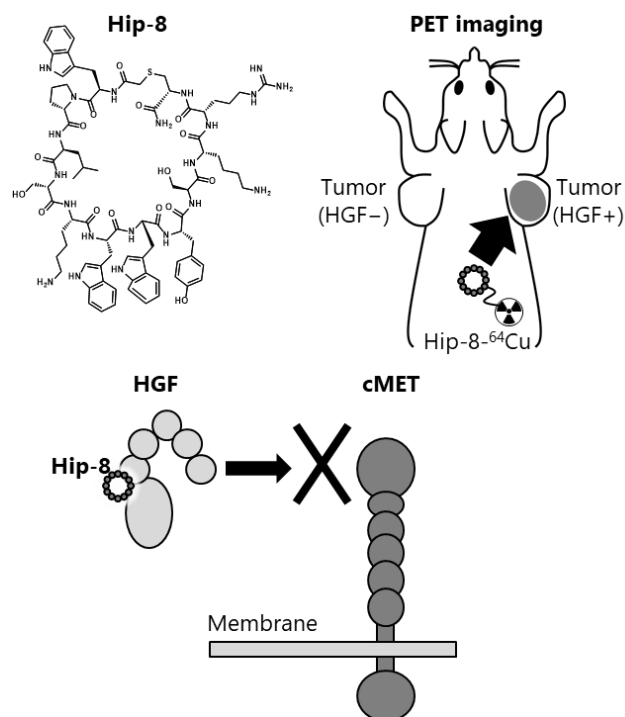


図 1 Hip-8 の化学構造、阻害作用機構、PET イメージングの概略図。

1.(1)-8) *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 598-606 (2019)

(2) 酵素修飾と化学的骨格変換により、 $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 結合を主鎖に含むペプチドの翻訳合成に成功

$\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 構造は、アミド結合の生物学的等価体として知られ、生物活性ペプチドミメティクス薬剤の開発に広く用いられている。本研究では、 $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 含有ペプチドを試験管内翻訳合成系を用いて生産するために、酵素修飾と化学的骨格変換とを組み合わせた翻訳後修飾法を考案した。具体的には、Cys およびその誘導体の酵素的脱水環化反応によるチアゾリン環形成とその後の温和な化学的還元反応からなり、ペプチド鎖中の特定のアミド結合を形式的に還元することができる。本手法は、様々なペプチド配列に適用可能であり、 $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ を含むペプチドミメティクスの簡易生産や、 $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 含有ペプチドの大規模ライブラリーの構築に応用可能である。

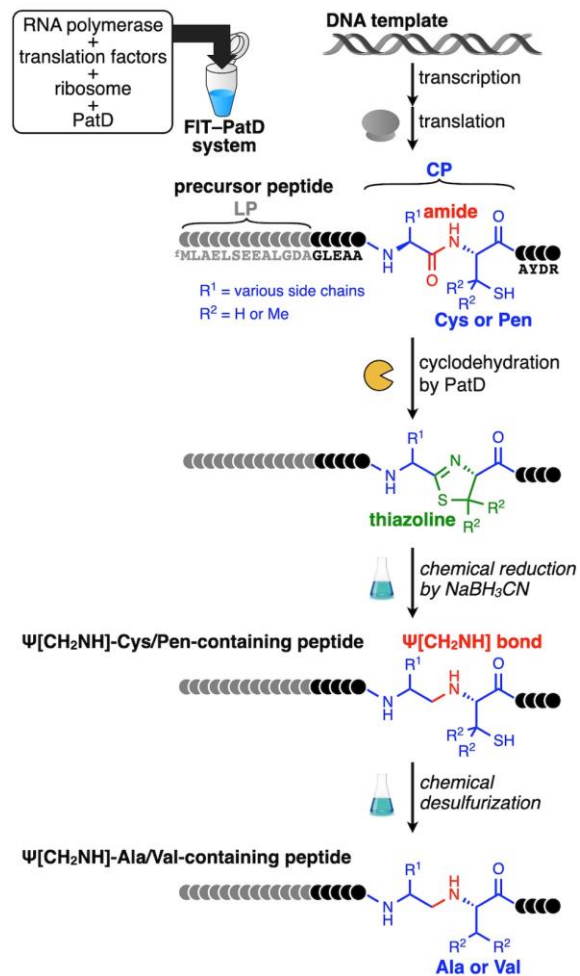


図 2 主鎖 $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$ 骨格を有するペプチドの試験管内翻訳合成のスキーム。酵素修飾と化学的骨格変換との組み合わせにより、翻訳反応で形成したアミド結合を形式的に還元する。

1.(1)-3) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **59**, 684-688 (2019)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) R. Maini, H. Kimura, R. Takatsuji, T. Katoh, Y. Goto & H. Suga. "Ribosomal Formation of Thioamide Bonds in Polypeptide Synthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 20004-20008 (2019).
- 2) Y. Yin, N. Ochi, T.W. Craven, D. Baker, N. Takigawa & H. Suga. "De Novo Carborane-Containing Macrocyclic Peptides Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor", *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 19193-19197 (2019).
- 3) Y. Kato, T. Kuroda, Y. Huang, R. Ohta, Y. Goto & H. Suga. "Chemoenzymatic Posttranslational Modification Reactions for the Synthesis of Ψ [CH₂NH]-Containing Peptides", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **59**, 684-688 (2019).
- 4) S.T.P. Tran, C.J. Hipolito, H. Suzuki, R. Xie, H.D. Kim Tuyen, P.T. Dijke, N. Terasaka, Y. Goto, H. Suga & M. Kato. "Generation of non-standard macrocyclic peptides specifically binding TSC-22 homologous gene-1", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **516**, 445-450 (2019).
- 5) M. Nawatha, J.M. Rogers, S.M. Bonn, I. Livneh, B. Lemma, S.M. Mali, G.B. Vamisetti, H. Sun, B. Bercovich, Y. Huang, A. Ciechanover, D. Fushman, H. Suga & A. Brik. "De novo macrocyclic peptides that specifically modulate Lys48-linked ubiquitin chains", *Nat. Chem.*, **11**, 644-652 (2019).
- 6) H. Hirose, T. Hideshima, T. Katoh & H. Suga. "A Case Study on the Keap1 Interaction with Peptide Sequence Epitopes Selected by the Peptidomic mRNA Display", *Chembiochem*, **20**, 2089-2100 (2019).
- 7) C. Tsiamantas, S. Kwon, C. Douat, I. Huc & H. Suga. "Optimizing aromatic oligoamide foldamer side-chains for ribosomal translation initiation", *Chem. Commun.*, **55**, 7366-7369 (2019).
- 8) K. Sakai, T. Passioura, H. Sato, K. Ito, H. Furuhashi, M. Umitsu, J. Takagi, Y. Kato, H. Mukai, S. Warashina, M. Zouda, Y. Watanabe, S. Yano, M. Shibata, H. Suga & K. Matsumoto. "Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor", *Nat. Chem. Biol.*, **15**, 598-606 (2019).
- 9) T. Fujino, T. Kondo, H. Suga & H. Murakami. "Exploring of minimal RNA substrate of flexizymes", *Chembiochem*, (2019).
- 10) T. Katoh & H. Suga. "Flexizyme-catalyzed synthesis of 3'-aminoacyl-NH-tRNAs", *Nucleic. Acids. Res.*, **47**, e54 (2019).
- 11) Y. Yin, Q. Fei, W. Liu, Z. Li, H. Suga & C. Wu. "Chemical and Ribosomal Synthesis of Topologically Controlled Bicyclic and Tricyclic Peptide Scaffolds Primed by Selenoether Formation", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **58**, 4880-4885 (2019).
- 12) R. Takatsuji, K. Shinbara, T. Katoh, Y. Goto, T. Passioura, R. Yajima, Y. Komatsu & H. Suga. "Ribosomal Synthesis of Backbone-Cyclic Peptides Compatible with In Vitro Display", *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 2279-2287 (2019).
- 13) T.P. Christoph Nitsche, Paul Varava, Mithun C. Mahawaththa, Mila M. Leuthold, Christian D. Klein, Hiroaki Suga and Gottfried Otting. "De Novo Discovery of Nonstandard Macrocyclic Peptides as Noncompetitive Inhibitors of the Zika Virus NS2B-NS3 Protease", *ACS Med. Chem. Lett.*, **10**, 168-174 (2019).
- 14) S.R. Fleming, T.E. Bartges, A.A. Vinogradov, C.L. Kirkpatrick, Y. Goto, H. Suga, L.M. Hicks & A.A. Bowers. "Flexizyme-enabled benchtop biosynthesis of thiopeptides", *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 758-762 (2019).

2. 総説・解説

- 1) C. Tsiamantas, M.E. Otero-Ramirez & H. Suga. "Discovery of Functional Macrocyclic Peptides by Means of the RaPID System", *Methods Mol. Biol.*, **2001**, 299-315 (2019).
- 2) T. Katoh & H. Suga. "Engineering Translation Components Improve Incorporation of Exotic Amino Acids", *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (2019).
- 3) A.A. Vinogradov, Y. Yin & H. Suga. "Macrocyclic Peptides as Drug Candidates: Recent Progress and Remaining Challenges", *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 4167-4181 (2019).
- 4) Y. Huang, M.M. Wiedmann & H. Suga. "RNA Display Methods for the Discovery of Bioactive Macrocycles", *Chem. Rev.*, **119**, 10360-10391 (2019).
- 5) 後藤佑樹・井上澄香・菅裕明「RiPP 生合成経路の改変による人工ペプチド生産」*ファルマシア*, **55**, 662-7 (2019).
- 6) S. Futaki, K. Matsuzaki, and Y. Goto. " Meeting Peptides in Kyoto", *Chembiochem*, **20**, 2015-2016 (2019).

3. 著書

- 1) 西村仁孝・新原光貴・加藤敬行・菅裕明「第4章 ペプチドの環化手法と特殊環状ペプチドライブラリー構築への応用」ペプチド創薬の最前線シーエムシー出版、第4章、p29-37 (2019)
- 2) 後藤佑樹「 RiPP 生合成経路の改変による天然物ペプチドの人工誘導体の合成」ペプチド創薬の最前線、シーエムシー出版 (2019).

4. その他

- 1) 国際公開 WO2019/234751, 「Ubiquitin high affinity cyclic peptides and methods of use thereof」, 菅裕明, ROGERS Joseph, Ashraf Brik, Mickal Nawatha (国立大学法人東京大学, Technion research and development foundation ltd)
- 2) 国際公開 WO2019/139126, 「NTCP 阻害剤」, 菅裕明, パシオウラトビー, 渡士幸一, 脇田隆宇 (国立大学法人東京大学, 国立感染症研究所)
- 3) 21. 国際公開 WO2019/077887, 「D-アミノ酸及びβ-アミノ酸の取り込みを増強する tRNA の D 及び T アームの改変」, 菅裕明, 加藤敬行 (国立大学法人東京大学)
- 4) 20. 国際公開 WO2019/026920, 「環状ペプチドをタンパク質構造に提示させる超汎用法」, 菅裕明, 高木淳一 (国立大学法人東京大学, 国立大学法人大阪大学)