

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

事業名 : 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名 : (日本語) RaPID 基盤技術が拓く構造生命科学と創薬の飛躍的加速
(英語) The RaPID platform system that accelerates the processes of structural
biology and drug discovery

補助事業担当者 (日本語) 東京大学大学院理学系研究科 教授 菅 裕明
所属 役職 氏名 : (英語) Hiroaki Suga, Professor,
Graduate School of Science, The University of Tokyo

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

膜蛋白質等、ダイナミクスの高い蛋白質の結晶構造解析においては、その結晶化や解像度の向上が困難な場合に直面することがしばしばある。本研究計画は、当研究室で開発した新技術 RaPID システムを用いることで、望みの蛋白質に極めて高い親和性をもつ環状化修飾ペプチド (以下特殊ペプチド) リガンドを迅速に獲得し、蛋白質-特殊ペプチドの共結晶化を達成することで、一連の研究プロセスを飛躍的に加速させることを提案した。本研究では、一人でも多くの国内構造生物学者がこの技術の恩恵を受け、日本発の構造生命科学と創薬研究の新潮流を拓くために、共同研究を活発に進めた。また、本研究計画で得られる特殊ペプチドは、そのユニークな環状化構造や主骨格修飾により極めて強固な構造により、ペプチダーゼ耐性や膜透過性が付与されたペプチド分子でもある。すなわち、特殊ペプチドは蛋白質の結晶構造解析補助のリガンドとしての機能だけでなく、標的蛋白質が薬剤標的であれば薬剤創出にも直結する。この技術の特徴を最大限に生かし、細胞外あるいは細胞内蛋白質相互作用を標的としたアンタゴニストやアゴニスト等の薬剤候補を提供することを目指した。また、高度化として、RaPID システムをセミ自動化するために2腕ロボットとのインテグレーションを進め、そのプログラムおよびプロトコール開発を進めることを目指した。

支援に関しては、下記のメニューを設定した。

- ① 標的蛋白質の固定化するためのタグデザインと条件検討
- ② 特殊ペプチドの RaPID セレクション
- ③ 活性特殊ペプチドの同定と合成

平成 24 年 10 月から平成 29 年 3 月までの間で、計 17 件の案件を支援してきた。その研究者の所属大学を挙げると、東京大学（4 件）、京都大学（3 件）、大阪大学（3 件）、九州大学（1 件）、名古屋大学（1 件）、金沢大学（1 件）、筑波大学（2 件）、横浜市立大学（1 件）、神戸大学（1 件）に渡る。全ての案件について上記の支援メニューをこなしたが、うち標的タンパク質の会合等により目的の特殊ペプチドが獲得できなかった案件は 5 件のみで、12 件の案件については高い結合能力をもつ特殊ペプチドを発見し、非支援者に提供した。さらにそのうち、3 件に関しては論文発表・特許出願に至り、2 件に関しては論文発表できるだけの成果が上がっている。

高度化に関しては、下記のメニューを設定した。

- ④ 活性特殊ペプチドと標的蛋白質との共結晶化と高解像度化
- ⑤ 活性特殊ペプチドの薬剤活性の評価と高機能化
- ⑥ ロボット開発による RaPID システムの自動化

上記の支援において、被支援者の依頼によって対応して測定可能な標的に関しては全て SPR 解析を行った。また、被支援者の要望に応じ、特殊ペプチドの化学合成を行い、非支援者への再提供も進めた。⑥については、RaPID システムを運用できる 2 腕型ロボットを導入し、様々な問題を徐々に解決しながらプログラムの微修正と運用プロトコルの作製に注力してきた。その結果、平成 28 年度末までに Avi タグ、Fc タグ、His タグの 3 種類の標的タンパク質に対してセレクションを可能にするプロトコルを確立し、人の手の結果と遜色ないセレクションデータの獲得に成功した。

【英文】

Crystallographic structural analysis of proteins which are highly dynamic such as membrane proteins often makes difficult to crystalize with high resolutions. This proposed research was aimed at developing structurally constrained peptides by macrocyclization against various target proteins, including such membrane proteins, by means of the RaPID system devised in our laboratory, and then provide them to researchers to accelerate the structural biology and drug discover processes. Thus, this program had set various collaborations with researchers who conduct structural biology and medical research, emphasizing the interest of drug discovery in academics. Note that the macrocyclic peptides discovered from the RaPID system have properties of peptidase/protease resistance and occasionally cell membrane permeability. Thus, they are suitable not only ligands for protein crystallization but also drugs lead discovery. In this program, we had maximized the use of the RaPID technology to discover not only antagonists but also agonists against membrane proteins and other intracellular proteins. In order to increase the potentials of the RaPID system, we also set a goal to integrate a two-arm robot with the RaPID system and develop its program and protocol for the semi-automated selection.

The menus for the collaboration was set below:

- ① Design of tags and optimization of conditions to immobilize the target proteins on beads

② RaPID selection of macrocyclic peptides against the targets

③ Identification of active species and their chemical synthesis

From October 2012 to March 2017, we set 17 collaborations with various researchers, who are in U. Tokyo (4), Kyoto U. (3), Osaka U. (3), Kyushu U. (1), Nagoya U. (1), Kanazawa U. (1), Tsukuba U. (2), Yokoyama City U. (1), Kobe U. (1). We performed all of the above menu to select macrocyclic peptide ligands against the individual target proteins. The desired macrocyclic peptide ligands were discovered against 12 out of 17 target. Among them three of these led to publications in major research journals as well as disclosure of the patents. Two other collaborations are also under investigation to collect data for publication/patent. Despite the success rate is quite high, we failed isolating macrocyclic peptide ligands against 5 targets, due to unexpected poor behaviors of target proteins for immobilization on beads or non-uniformed structure of proteins.

For the technical advancement of the macrocyclic peptides toward drug development and RaPID system, we set the menus below.

④ Co-crystallization of target protein with macrocyclic peptide and high resolution structural analysis

⑤ Evaluation of macrocyclic peptides for biological activities and improvement of drug potentials

⑥ Semi-automation of the RaPID system using a two-arm robot

The ④ and ⑤ menus were conducted by the request of our collaborators. We also developed the program/protocol of robot for semi-automation processes. We now completed the system established for proteins with 3 different tags often used for the RaPID selection.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 22 件）

1. Kawamura, M. Münzel, T. Kojima, C. Yapp, B. Bhushan, Y. Goto, A. Tumber, T. Katoh, O.N. King, T. Passioura, L.J. Walport, S.B. Hatch, S. Madden, S. Müller, P.E. Brennan, R. Chowdhury, R.J. Hopkinson, H. Suga*, C.J. Schofield “Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides” **Nature Communications**, (2017) Apr. 6, 14773. Doi: 10.1038/ncomms14773
2. H. Yu, P. Dranchak, Z. Li, R. MacArthur, M.S. Munson, N. Mehzabeen, N.J. Baird, K.P. Battalie, D. Ross, S. Lovell, C.K. Carlow, H. Suga*, Inglese, J. “Macrocycle peptides delineate locked-open inhibition mechanism for microorganism phosphoglycerate mutases” **Nature Communications**, (2017) Apr. 3, 14932. Doi: 10.1038/ncomms14932.
3. S.A. Jongkeess, S. Caner, C. Tysoe, G.D. Brayer, S.G. Withers, H. Suga* “Rapid discovery of potent and selective glycosidase-inhibiting de novo peptides” **Cell Chemical Biology**, (2017) 24, 381-390. Doi: 10.1016/j.chembiol.2017.02.001

4. T. Passioura, H. Suga* "A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets" **Chemical Communications**, (2017) 53, 1931-1940. Doi: 10.1039/c6cc06951g
5. S. A. K. Jongkees, S. Umemoto, H. Suga* "Linker-free incorporation of carbohydrates into *in vitro* displayed macrocyclic peptides", **Chemical Science**, (2017) 8, 1474-1481. doi:10.1039/C6SC04381J.
6. Y. Matsunaga, N.K. Bashiruddin, Y. Kitago, J. Takagi, H. Suga* "Allosteric inhibition of a semaphorin 4D receptor plexin B1 by a high affinity macrocyclic peptide", **Cell Chemical Biology**, (2016) 23, 1341-1350. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.09.015>
7. K. Iwasaki; Y. Goto; T. Katoh; T. Yamashita; S. Kaneko; H. Suga* "Fluorescent imaging probe based on a macrocyclic scaffold that binds to cellular EpCAM", **Journal Molecular Evolution**, (2015) 81, 210-217.
8. J.M. Rogers; H. Suga*, "Discovering functional, non-proteinogenic amino acid containing peptides using genetic code reprogramming", **Organic Biomolecular Chemistry**, 13, 9353-9363 (2015).
9. S.A.K. Jongkees; C.J. Hipolito; J.M. Rogers; H. Suga* "Model foldamers: applications and structures of stable macrocyclic peptides identified using *in vitro* selection" **New Journal of Chemistry**, (2015) 39, 3197.
10. K. Ito; K. Sakai; Y. Suzuki; N. Ozawa; T. Hatta; T. Natsume; K. Matsumoto; H. Suga* "Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds" **Nature Communications**, (2015) 6, 6373.
11. T. Morioka; N.D. Loik; C.J. Hipolito; Y. Goto; H. Suga* "Selection-based discovery of macrocyclic peptides for the next generation therapeutics" **Current Opinion in Chemical Biology**, (2015) 26, 34-41.
12. T. Passioura; H. Suga* "Reprogramming the genetic code *in vitro*" **Trends in Biochemical Sciences**, (2014) 39, 400-408.
13. N.K. Bashiruddin; H. Suga "Construction and screening of vast libraries of natural product-like macrocyclic peptides using *in vitro* display technologies" **Current Opinion in Chemical Biology**, (2014) 24C, 131-138.
14. K. Kumazaki, T. Tsukazaki, T. Nishizawa, Y. Tanaka, H.E. Kato, Y. Nakada-Nakura, K. Hirata, Y. Mori, H. Suga, N. Dohmae, R. Ishitani, O. Nureki "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from *Bacillus halodurans*" **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, (2014) F70, 1056-1060.
15. C.J. Hipolito, N.K. Bashiruddin, H. Suga* "Protein cocrystallization molecules originating from *in vitro* selected macrocyclic peptides" **Current Opinion in Structural Biology**, (2014) 26, 24-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2014.03.001>
16. A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Sakiyama, C.J. Hipolito, A. Fujioka, R. Hirokane, K. Ikeguchi, B. Watanabe, J. Hiratake, Y. Kimura, H. Suga, K. Ueda, H. Kato. "Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog" **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, (2014) 111, 4049-4054.

17. K. Yamagata, Y. Goto, H. Nishimasu, J. Morimoto, R. Ishitani, N. Dohmae, N. Takeda, R. Nagai, I. Komuro, H. Suga*, O. Nureki “Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change” **Structure**, (2014) 22, 345-352.
18. N. Terasaka, H. Suga* “Flexizymes-facilitated genetic code reprogramming leading to the discovery of drug-like peptides” **Chemistry Letters**, (2014) 43, 11-19.
19. Y. Goto, M. Iseki, A. Hitomi, H. Murakami, and H. Suga* “Non-standard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons” **ACS Chemical Biology**, (2013) 8, 2630-4.
20. 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**, (2013) 18, 10514-30.
21. 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**, (2013) 496, 247-251.
22. T. Passioura, H. Suga* “Flexizyme-mediated genetic reprogramming as a tool for noncanonical Peptide synthesis and drug discovery” **Chemistry European Journal**, (2013) 19, 6530-6536.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

国内会議まで含めると膨大な数になるため割愛し、国際会議のみ記載する。以下、全て菅裕明による口頭発表、発表題目は「A RaPID way to discover pseudo-natural peptides against therapeutic targets」あるいはそれに準じたタイトルで講演した。国内、国外は記載した場所で特定可能なため記載を割愛した。

2016

1. The 8th Takeda Science Foundation International Symposium on PharmaSciences, Osaka, Japan, 1/21, 2016
2. Banyu-Fukuoka Symposium, Fukuoka, Japan, 4/23, 2016
3. International RNA meeting 2016, Kyoto, Japan, 6/29, 2016
4. Banyu-Sapporo Symposium, Sapporo, Japan, 7/2, 2016
5. EMBO Conference-Chemical Biology, Heidelberg, Germany, 9/2, 2016
6. tRNA conference 2016, Jeju, Korea, 9/8, 2016
7. Plenary Lecture in Novartis Pharma Oncology Meeting, Tokyo, Japan, 9/10, 2016
8. Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Sendai, Japan, 9/27, 2016
9. Gold Medal Awardee Lecture, Max-Bergmann Conference 2016, Ilsenburg, Germany, 10/11, 2016
10. Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms GIM2016, Wuhan, China, 10/19, 2016

11. The 1st international PSL Chemical Biology Symposium, Paris, France, 12/9, 2016

2015

12. Joint International Symposium on TGF-beta and Cancer, Japan, 1/11, 2015

13. Japan-France Symposium on Molecular Technology, Paris, 3/9, 2015

14. Annual Meeting of the Japanese Chemical Society, 3/26, 2015

15. Gordon Research Conference, High Throughput Chemistry and Chemical Biology, New Hampshire USA, 6/18, 2015

16. Royal Society of Chemistry; Peptide Meeting, London, UK, 7/9, 2015

17. Plenary Lecture in National Italian Meeting of Organic Chemistry, Bologna, Italy, 9/15, 2015

18. Aminoacyl-tRNA synthetases 2015, Barcelona, Spain, 10/18, 2015

19. 11th Australian Peptide Conference, Kingscliff, NSW, Australia, 10/29, 2015

20. Plenary Lecture, the 3rd International Conference on Circular Proteins, Brisbane, Australia, 11/3, 2015.

21. Ostuka Pharma, Symposium of Organic Synthetic Chemistry 2015, Tokushima, Japan, 11/20, 2015.

22. Biochemistry and Molecular Biology 2015, Symposium for Pharmaceuticals, Kobe, Japan, 12/2, 2015

23. PacifiChem 2015, Advances in Peptide and Protein Chemistry, Honolulu, Hawaii, USA, 12/7, 2015

24. PacifiChem 2015, Synthetic Modulators of Protein-Protein Interactions, Honolulu, Hawaii, USA, 12/7, 2015

2014

25. Plenary Lecture in AsiaTIDES: Oligonucleotide and Peptide Research, Technology and Product Development, Tokyo, Japan, 2/25, 2014

26. Japan-UK Science, Technology and Innovation symposium 2014, London, UK, 3/5, 2014.

27. Frontier of Drug Discovery -Novel Chemistry, IVA's Conference Centre, Stockholm, Sweden, 3/3, 2014.

28. 2014 American Association of Cancer Research, San Diego, 4/6, 2014.

29. Bachem symposium "Macrocycles and Constrained Peptides", Basel, Switzerland, 4/9, 2014.

30. Next Generation Protein Therapeutics Summit, San Francisco, USA, 6/5, 2014.

31. Japanese Society of Chemical Biology, Osaka, Japan, 6/11, 2014.

32. Chemical Biology meets Drug Discovery meeting, Royal Society of Chemistry, Surrey, UK, 6/12, 2014.

33. Pre-COST meeting "Innovation", Siena, Italy, 6/25, 2014

34. International Conference on Medicinal Chemistry 2014, Rouen, France, 7/1, 2014

35. The Origin 2014, Nara, Japan, 7/10, 2014

36. Switzerland-Japan Chemical Biology Symposium, Bern, Switzerland, 8/1, 2014

37. Japanese Peptide Society Symposium, Akabori Memorial Award 2014 Lecture, Tokushima, Japan, 10/22, 2014

38. Development and Application of Naturel Products, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 11/05, 2014
39. Cold Spring Harbor Asia "Synthetic Biology", Suzhou, China, 12/04, 2014
40. Joint symposium of the Institute of Convergent Technology at Seoul National University and the Research Center for Advanced Science and Technology at the University of Tokyo, Seoul, Korea, 11/28, 2014
41. Asian Chemical Biology Symposium, Singapore, 12/15, 2014

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「特殊ペプチドを基軸とした創薬基盤技術の開発」読売テクノフォーラム東京講演会、菅裕明、東京、2016/5/28、国内
2. 「特殊ペプチドを基軸とした創薬基盤技術の開発」読売テクノフォーラム大阪講演会、菅裕明、大阪、2016/7/18、国内
3. 「特殊ペプチド創薬イノベーション」本田財団懇談会、菅裕明、東京、2016/3/2、国内

(4) 特許出願

1. 新規人工翻訳合成系、菅裕明、後藤佑樹、村上裕、登録日 2015. 4. 10、特許第 5725467 号 (13/816911 (US)、11820026.0 (EP)、201180052318.9 (CN))
2. 環状ペプチド化合物の合成方法、菅裕明、村上裕、後藤佑樹、佐古佑介、足海洋史、山岸裕介、登録日 2014. 9. 5、特許第 5605602 号 (5605602 (JP) 2014/9/5、9090668 (US) 2015/7/28)
3. c-Met タンパク質アゴニスト、菅裕明、伊藤健一郎、出願日 2013. 10. 15、特願 2013-214771 (PCT/JP2014/77437)

1年6ヶ月以内に2件の出願があるが、公開前のため割愛する。