

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年4月27日(27.04.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/068296 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 1/113 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C40B 40/08 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/038924

(22) 国際出願日: 2022年10月19日(19.10.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2021-170768 2021年10月19日(19.10.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 菅 裕明(SUGA, Hiroaki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 後藤 佑樹(GOTO, Yuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国

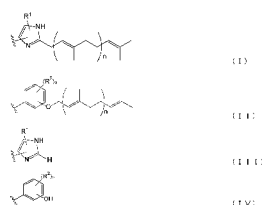
立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). ザン ウチエン(ZHANG Yuchen); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 岡田 正弘(OKADA, Masahiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森タワー23階 T M I 総合法律事務所 Tokyo (JP).

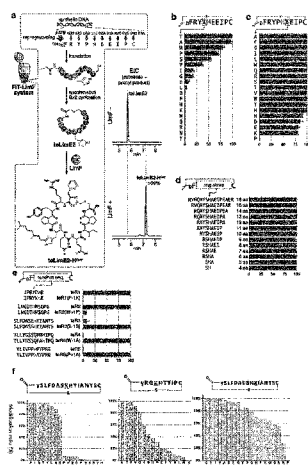
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING COMPOUNDS, METHOD FOR PRODUCING COMPOUND LIBRARY, COMPOUND LIBRARY, AND SCREENING METHOD

(54) 発明の名称: 化合物の製造方法、化合物ライブラリーの製造方法、化合物ライブラリー及びスクリーニング方法



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing compounds that have at least one structure represented by formula (I) or (II), wherein the production method comprises a step for contacting a compound having at least one structure represented by formula (III) or (IV) with a prenyl transferase in order to introduce a prenyl group into said structure. This prenyl transferase is LimF or an enzyme exhibiting homology therewith. [Chem. 1]



(57) 要約: 本発明は、下記式 (I) 又は (II) で表される構造を少なくとも1つ有する化合物の製造方法であって、下記式 (III) 又は (IV) で表される構造を少なくとも1つ有する化合物をプレニル基転移酵素に接触させて前記構造にプレニル基を導入する工程を含み、前記プレニル基転移酵素は、LimF又はそれと同一性を有する酵素である、製造方法に関する。【化1】

[続葉有]

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

化合物の製造方法、化合物ライブラリーの製造方法、化合物ライブラリー及びスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、化合物の製造方法、化合物ライブラリーの製造方法、化合物ライブラリー及びスクリーニング方法に関する。また、ペプチド又はタンパク質の製造方法、ペプチド又はタンパク質ライブラリーの製造方法、ペプチド又はタンパク質ライブラリー及びスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] プレニル化は、テルペノイド、ポリケチド、非リボソームペプチド、及びリボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド（R i P P s）を含む多様な天然産物生合成経路と同様に、一次代謝に分布する普遍的な修飾である。プレニル化は、これらの天然産物の多様な生物活性においてしばしば重要な役割を果たす。なぜなら、プレニル基は、一般に、分子の親油性及び脂質膜との相互作用を高め、それによって望ましいバイオアベイラビリティ及び膜透過性をもたらすからである。プレニル基のこのような特性は、膜透過性が低いことで知られるペプチド製剤の開発において、特に関心をもたれている。低膜透過性を克服するための最も成功した重要な戦略の1つとしてアルキル化が知られ、リラグルチド及びインスリンデテミル等のペプチド製剤の開発に医薬的に用いられている。

従って、ペプチドのプレニル化のための新しい生体触媒を開発することは、合成生物学のためのツールボックスを拡大するだけでなく、創薬のための生理活性ペプチド設計を促進する。

[0003] R i P P のクラスであるシアノバクチンの生合成に関与するプレニル基転移酵素（プレニルトランスフェラーゼ；P T a s e）は、多様なペプチドに対してプレニル化生体触媒として利用できる興味深い酵素である。このよう

なプレニル基転移酵素、いわゆるFファミリー酵素は、溶媒にさらされる特有の空洞をもつ短縮型 α/β P T a s e バレル折りたたみ構造をとり、大きなペプチド基質の結合を可能にする。この独特な構造は、プレニル基ドナー及びアクセプター残基に対する厳密な選択性をもたらすものの、全体的な基質ペプチド配列の選択性は緩いため、容易で多用途のペプチドアルキル化のための有望な生体触媒となる。類似する三次構造を有しながらも、Fファミリーのプレニル基転移酵素は多様なプレニル化を触媒する。これまで、ペプチド基質に対してT y r O-プレニル化活性、T r p C又はN-プレニル化活性、A r g N-プレニル化活性、S e r / T h r O-プレニル化活性、又は末端N-及びC-プレニル化活性を有する、特定のプレニル基転移酵素がこのファミリーで報告されている（特許文献1、非特許文献1～6）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2020/080490号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Hao, Y. et al. Molecular basis for the broad substrate selectivity of a peptide prenyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 14037-14042 (2016).

非特許文献2：Dalponte, L. et al. N-Prenylation of tryptophan by an aromatic prenyltransferase from the cyanobactin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 57, 6860-6867 (2018).

非特許文献3：Tianero, M.D. et al. Metabolic model for diversity-generating biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 1772-1777 (2016).

非特許文献4：Phan, C.-S. et al. Argicyclamides A-C Unveil Enzymatic Basis for Guanidine Bis-prenylation. *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 10083-10087 (2021).

非特許文献5: Parajuli, A. et al. A Unique Tryptophan C-Prenyltransferase from the Kawaguchipectin Biosynthetic Pathway. *Angew. Chem.*, 55, 3596-3599 (2016).

非特許文献6: Okada, M. et al. Stereospecific prenylation of tryptophan by a cyanobacterial post-translational modification enzyme. *Org. Biomol. Chem.*, 14, 9639-9644 (2016).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 既報のプレニル化の中で、C-プレニル化は最も魅力的な修飾の一つである。なぜなら、炭素-炭素結合の形成は、分子の炭素骨格を構築するための生物化学と有機化学の両方にとって中心的な重要性をもつからである。

しかしながら、ほとんどのFファミリープレニル基転移酵素は電子リッチなヘテロ原子のプレニル化を触媒することが知られている。シアノバクチン合成遺伝子クラスター(BGC)においてC-プレニル化活性を有する既知のプレニル基転移酵素は、Trp C-3プレニル化を触媒するカワグチペプチンBGC由来のKgpFのみである(非特許文献5~6)。したがって、プレニル化天然物の化学空間を拡大するだけでなく、種々の生理活性ペプチドの多様なアルキル化のための潜在的な生体触媒を提供するために、前例のないアクセプターに対しC-プレニル化を触媒する新規なプレニル基転移酵素を探索することが望まれる。

[0007] また、C-プレニル化に限らず、多様な基質をプレニル化することのできるプレニル基転移酵素、及びプレニル化方法を探索することも望まれる。

[0008] 本発明は、上記のいずれかの課題を解決し得るプレニル化された化合物の新規な製造方法、及びプレニル化された化合物ライブラリーの新規な製造方法等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、LimFを始めとする所定のプレニル基転移酵素が、新規なC-プレニル化を触媒

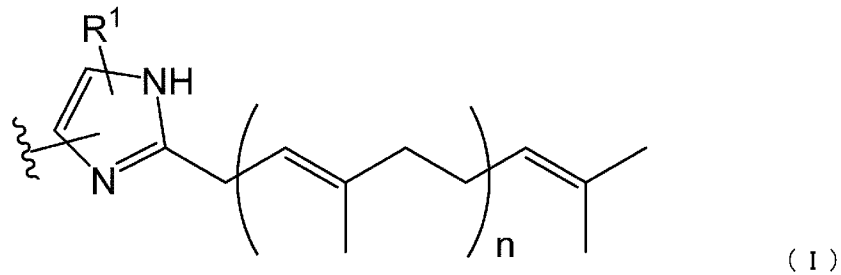
できるだけでなく、様々な基質に対するプレニル化を触媒することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は以下のとおりである。

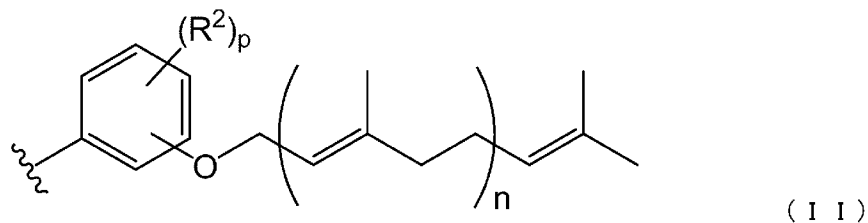
[1]

下記式(Ⅰ)又は(ⅠⅠ)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物の製造方法であって、

[化1]



[化2]



(上記式(Ⅰ)中、R¹は水素原子又は任意の置換基であり、nは0～11の整数を示し、

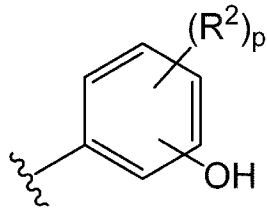
上記式(ⅠⅠ)中、R²はそれぞれ独立して、任意の置換基であり、pは0～4の整数を示し、nは0～11の整数を示す。)

下記式(ⅠⅠⅠ)又は(ⅠⅤ)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物をプレニル基転移酵素に接触させて前記構造にプレニル基を導入する工程を含み、

[化3]



[化4]



(IV)

(上記式 (III) 及び式 (IV) 中、 R^1 、 R^2 及び p は、前記と同義である。)

前記プレニル基転移酵素は、LimF 又はそれと相同性を有する酵素である、

製造方法。

[2]

少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質をプレニル基転移酵素に接触させ、少なくとも1つのHis残基、Tyr残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する、[1]に記載の製造方法。

[3]

少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーをプレニル基転移酵素に接触させ、少なくとも1つのHis残基、Tyr残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する工程を含み、

前記プレニル基転移酵素は、LimF 又はそれと相同性を有する酵素である、

プレニル化されたペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーの製造方法。

[4]

mRNAライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳し、少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む前記化合物ライブラリーを調製する工程を更に含む、

[3] に記載の製造方法。

[5]

前記化合物ライブラリーにおける前記ペプチド又は前記タンパク質が、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質である、[3] 又は [4] に記載の製造方法。

[6]

mRNA ディスプレイ法により、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質を含む前記化合物ライブラリーを調製する工程を更に含み、

該工程は、

各 mRNA が少なくとも 1 つの His、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質をコードする mRNA ライブラリーを準備する工程と、

前記 mRNA ライブラリーの各 mRNA の 3' 末端にピューロマイシンを結合させ、ピューロマイシン結合 mRNA ライブラリーを製造する工程と、

前記ピューロマイシン結合 mRNA ライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳する工程と、を含む、[5] に記載の製造方法。

[7]

前記プレニル基転移酵素は、*Limnothrix* sp. 若しくは *Symploca* sp. に由来するプレニル基転移酵素、又はそれらと相同性を有する酵素を含む、[1] ~ [6] のいずれか 1 つに記載の製造方法。

[8]

前記プレニル基転移酵素は、以下の (1)、(2) 又は (3) に該当するアミノ酸配列を含む酵素を含む、[1] ~ [6] のいずれか 1 つに記載の製造方法。この態様において、前記プレニル基転移酵素は、(4) に該当するアミノ酸配列を含む酵素を含んでもよい。前記プレニル基転移酵素は、以下の (1)、(2)、(3) 又は (4) に該当するアミノ酸配列を有する酵素を含んでもよい。

(1) 配列番号 1 ~ 12 のいずれかで表されるアミノ酸配列

(2) 配列番号 1 ～ 12 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列

(3) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列

(4) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列

[9]

前記プレニル基転移酵素は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列、及びこれらのアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素からなる群より選択される少なくとも 1 つである、[1] ～ [6] のいずれか 1 つに記載の製造方法。

[10]

プレニル化された化合物が、4 以上のアミノ酸により形成される環状構造を有するペプチド又はタンパク質である、[1] ～ [9] のいずれか 1 つに記載の製造方法。

[11]

前記プレニル基転移酵素に接触される化合物がペプチド又はタンパク質であり、

該ペプチド又はタンパク質は、X a a 1 – X a a 2 で表される部分構造を有するか、N 末端に H i s、T y r、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有し、

X a a 1 は、中性アミノ酸であり、X a a 2 は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体である、[1] ～ [10] のいずれか 1 つに記載の製造方法。

[12]

前記プレニル基転移酵素に接触される化合物がペプチド又はタンパク質であり、

該ペプチド又はタンパク質は、X a a 2 – X a a 3 で表される部分構造を

有するか、C末端にH i s、T y r、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有し、

X a a 2は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体であり、X a a 3はP r o及びその誘導体以外の任意のアミノ酸である、[1]～[11]のいずれか1つに記載の製造方法。

[13]

[1]～[12]のいずれか1つに記載の製造方法により製造された、化合物ライブラリー。

[14]

[1]～[12]のいずれか1つに記載の製造方法により製造された化合物ライブラリーを標的物質に接触させる工程と、

前記標的物質に結合する化合物を選択する工程と、を含む、

標的物質に結合する化合物を同定するスクリーニング方法。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、プレニル化された化合物の新規な製造方法、及びプレニル化された化合物ライブラリーの新規な製造方法等を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]B l a s t p解析から得られたP T a s eのクラスターを示すS S Nを示す図である。(a) K g p Fをクエリとして用いたB l a s t p解析から得られたP T a s eのクラスターを示すS S Nを示す図である。(b) L i m Fをクエリとして用いたB L A S T p解析から得られたP T a s eのクラスターを示すS S Nを示す図である。

[図2]L i m n o t h r i x s p. C A C I A M 69 d由来の推定シアノバクチン遺伝子クラスター(B G C)が独特のP T a s eであるL i m Fを含むことを示す図である。(a) L i m Fを含む系統樹解析である。A g e M T P Tについては、P T a s eドメイン領域(275～559)をアラインメントに用いた。L i m F、S e r / T h r O - P T a s e、T y r

O-Pase、Trp N/C-Pase、及び末端N/O-Paseは、それぞれオレンジ (LimF)、青 (LynF、ToIF、TruF1)、淡青 (PirF、PagF)、緑 (KgpF、AcyF)、及び灰色 (MusF1、MusF2、AgeMTPT) でハイライトされている。

(b) シアノバクテリア *Limnothrix* sp. CACIAM 69d から見出したシアノバクチン関連 BGC を示す。LimE3 遺伝子は離れた位置にある遺伝子座にコードされている。(c) いくつかの既知シアノバクチン前駆体と、LimBGC 中に発見した推定前駆体ペプチド (LimE1-3) とを比較した配列アラインメントを示す。A ファミリープロテアーゼの認識配列 (RSII) 及び G ファミリー大環状化酵素の認識配列 (RSII) を青色で強調した。コアペプチド (CP) 領域は赤色で強調表示されている。

[図3] bcLimE2 の試験管内 LimF 処理により、ゲラニル化生成物である limnothamide が得られたことを示す図である。(a) 12 時間の LimF 処理前後の bcLimE2 の LC-MS 分析である。表示された抽出イオンクロマトグラム (EIC) は、基質 bcLimE2 及びゲラニル化生成物の全ての可能な電荷状態を含む。EIC で観測されたピーク領域を積分した質量スペクトルも示す。(b) NMR 分析で同定した limnothamide の構造である。His の C2 位置の C-フォワードゲラニル化を同定するための COSY 及び HMB C 相関を示す。

[図4] (a) bcLimE2 及び (b) LimF 修飾された bcLimE2 の MS/MS スペクトル及びその帰属を示す図である。フラグメンテーションのタイプ (b タイプ 及び a タイプ) が付記されている。

[図5] LimF 触媒 bcLimE2 プレニル化反応に対する (a) 温度、(b) pH 及び (c) 金属の影響を示す。(d) 標準条件における LimF の経時分析である。(e) LimF 活性の MgCl₂ 濃度依存性を示す。(f) LimF 活性の GPP 濃度依存性を示す。(g) 各 bcLimE2 基質濃度下で行った LimF によるプレニル化反応の反応速度を示す。

[図6]種々のHis含有ジペプチド ($Ac-XH-NH_2$ 及び $Ac-HX-NH_2$) のLimFによるHisプレニル化の結果を示す。なお、プレニル化反応は、 $20\mu M$ LimFで16時間反応を行った。

[図7]FIT-LimFシステムによるプレニル化teMPのワンポットin vitro生合成を示す図である。(a) FIT-LimFシステムにおけるteLimE2の発現及び修飾を示す。基質teLimE2及びその対応するプレニル化生成物のすべての可能な電荷状態を含むEICを示した。EICで観測したピークの面積に基づいて算出した修飾効率をクロマトグラム上に示す。(b) teLimE2の-1位変異導入を示す。棒グラフはLimF触媒プレニル化における変異体の修飾効率を示す。3回の独立した実験における結果を黒色のドットとして示し、その平均を棒グラフで、その標準偏差をエラーバーで示した。(c) teLimE2の+1位変異導入を示す。アスタリスクは-1位のHisが修飾されたことを示す。(d) 異なる環サイズのteMPのLimF修飾を示す。(e) 任意に選んだ全体配列を有するteMP (teR1-5) 及びそれらの-1又は+1位変異体におけるLimFによる修飾を示す。(f) 種々のペプチドにおける-1位及び+1位変異導入を示す。環状ペプチドの配列における「y」はD-Tyrを意味する。

[図8]FIT-LimFシステムによるプレニル化teMPのワンポットin vitro生合成の結果を示す図である。(a) 種々のランダムな全体配列を有する環状ペプチドのLimFによるプレニル化効率を示す。(b) 2以上のHis残基を有する環状ペプチドのLimFによるプレニル化を示す。(c) 遺伝暗号リプログラミングによって組み込まれたHis誘導体の修飾を示す。His残基と比較した各誘導体残基の構造変化を赤色で強調した。

[図9]LimFによるTyr O-プレニル化を示す図である。(a) teR6のLimF修飾が2つの異なるプレニル化産物を形成することを示す。基質であるteR6及びその単一プレニル化生成物の全ての可能な電荷状態を

含むE I Cを示した。H i s－プレニル化及びT y r－プレニル化生成物（t e R 6－H^{Ger}及びt e R 6－Y^{Ger}）に対応するピークは、オレンジ及び淡青色の点線でハイライトされている。（b）t e R 6－H^{Ger}とt e R 6－Y^{Ger}の質量スペクトルを示す。t e R 6－Y^{Ger}においては、プレニル部分の消失に由来するピークが示される。（c）NMR分析によって同定されたプレニル化トリペプチドの構造である。T y r－O－プレニル化を同定するための2 D－NMR相関を示す。（d）t e R 6－H 5 Aの－1位変異導入によるプレニル化の効率変化を示す。棒グラフはL i m Fによる変換効率を示す。アスタリスクは－1位のH i sがプレニル化されたことを示す。

[図10]L i m Fによるt e R 6－H 5 Aのプレニル化反応に対する（a）温度、（b）p H、及び（c）金属の影響を示す。また、L i m Fによるt e R 6－H 5 Aのプレニル化反応に対する（d）G P P、及び（e）M g C l₂の濃度依存性を示す。（f）t e R 6－H 5 Aの濃度を変更した際のプレニル化反応の反応速度を示す。

[図11]異なる反応モードに対するL i m F及びその変異体のプレニル化効率を示す図である。3つの独立した反応における修飾効率の平均値が示されている。顕著なH i s－プレニル化及びT y r－プレニル化を示す結果は、それぞれオレンジ（2行目2及び3列、5行目2列）及び水色（2行目4及び5列、5行目4及び5列、7行目5列、8行目4及び5列）で強調されている。

[図12]長さの異なる直鎖状ペプチドのL i m Fによるプレニル化を示す図である。最も長い配列を有する直鎖状ペプチドからは、プレニル化されたH i sを2つ有する産物も得られた。

[図13]高分子量のタンパク質（A c－B S A及びG S T）のL i m Fによるプレニル化を示す図である。（a）A c－B S A及び（b）G S Tについて、L i m Fによるプレニル化前後の質量スペクトルをそれぞれ示す。

[図14-1]配列番号1～13のアライメント結果の一部を示す。

[図14-2]配列番号1～13のアライメント結果の一部を示す。

[図15] G L P - 1 及びその誘導体の (a) 血清安定性試験、(b) D P P - 4 消化試験、及び (c) c A M P 生産活性化試験の結果を示す。

[図16] L i m F 及びその変異体における、H i s の - 1 位のアミノ酸とゲラニル化効率との関係を示す。Q 7 2 A 変異体、I 5 2 A 変異体、及び野生型 L i m F は、それぞれ上段、中段、及び下段に示される。

[図17] 複数のプレニル基転移酵素の配列アライメントを示す。

[図18] 各 L i m F 変異体における、プレニル基ドナーの種類とプレニル化効率との関係を示す。G P P (C 1 0)、及び D M A P P (C 5) は、それぞれ上段、及び下段に示される。

[図19] 選択的ファルネシル化が可能な L i m F 変異体の探索を示す。G P P (C 1 0)、及び F P P (C 1 5) は、それぞれ上段、及び下段に示される。

[図20] L i m F _ H 2 3 9 G / W 2 7 3 T 変異体による非天然基質のファルネシル化効率を示す。

発明を実施するための形態

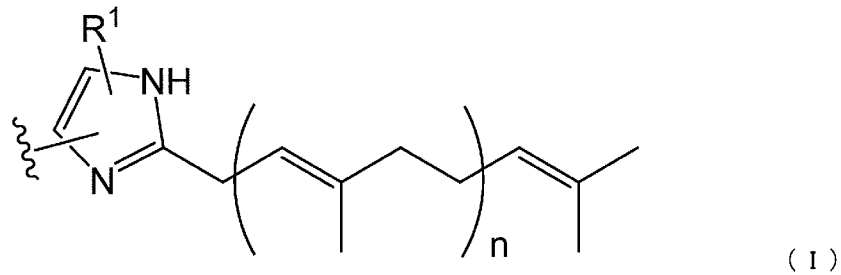
[0013] 以下、本発明を実施するための形態（以下、「本実施形態」という。）について詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で様々な変形が可能である。

なお、本明細書中、化学構造式における波線は、当該構造式で表される基の結合部位を意味する。

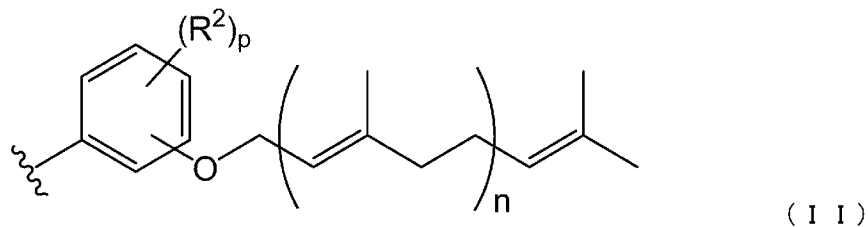
[0014] [プレニル化化合物の製造方法]

本実施形態の化合物の製造方法は、下記式 (I) 又は (I I) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物の製造方法であって、下記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物をプレニル基転移酵素に接触させて当該構造にプレニル基を導入する工程を含み、プレニル基転移酵素は L i m F 又はそれと相同性を有する酵素である製造方法である。

[化5]



[化6]



[化7]



[化8]



なお、式 (I) 中、 R^1 は水素原子又は任意の置換基であり、 n は 0 ～ 11 の整数を示し、式 (I I) 中、 R^2 はそれぞれ独立して、任意の置換基であり、 p は 0 ～ 4 の整数を示し、 n は 0 ～ 11 の整数を示し、式 (I I I) 及び式 (I V) 中、 R^1 、 R^2 及び p は、式 (I) 及び (I I) における定義と同義である。

[0015] 本実施形態の化合物の製造方法によれば、所定のプレニル基転移酵素を用いて、下記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物をプレニル化することにより、疎水性の高い化合物を製造すること

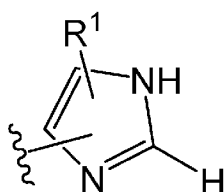
ができる。また、本実施形態の化合物の製造方法ではプレニル基転移酵素としてLimF又はそれと相同性を有する酵素を用いるため、プレニル基転移酵素の基質許容性が高く、プレニル基を有する多様な化合物を製造することができる。以上のとおり、本実施形態の化合物の製造方法によって、多様な化合物に効率よくプレニル基を導入でき、潜在的に細胞膜親和性及び／又は細胞膜透過性が高い化合物を製造することができる。

[0016] 以下、上記式(III)又は(IV)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物を、プレニル基転移酵素であるLimF又はそれと相同性を有する酵素に接触させて、上記式(I)又は(II)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物を得る工程を「プレニル化工程」という。

[0017] (基質)

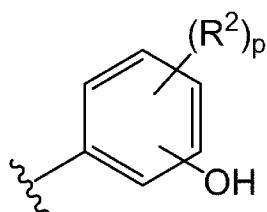
プレニル化工程における基質（以下、単に「基質」ともいう。）は上記式(III)又は(IV)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物であれば特に限定されない。

[化9]



(III)

[化10]



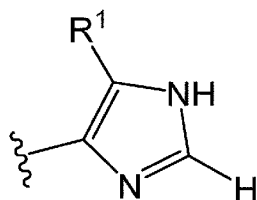
(IV)

式(III)中、R¹は水素原子又は任意の置換基であり、式(IV)中、R²はそれぞれ独立して、任意の置換基であり、pは0～4の整数を示す。

[0018] 上記式(III)で表される構造は、下記式(III-1)又は(III-2)のいずれかで表される構造を意味する。また、上記式(IV)で表される構造は、下記式(IV-1)、(IV-2)又は(IV-3)のいずれ

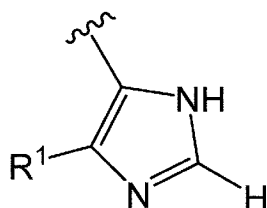
かで表される構造を意味する。式 (111-1) 及び (111-2) において、 R^1 は式 (111) の定義と同義であり、式 (1V-1)、(1V-2) 及び (1V-3) において、 R^2 及び p は式 (1V) の定義と同義である。

[化11]



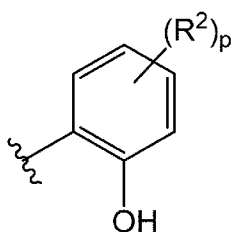
(111-1)

[化12]



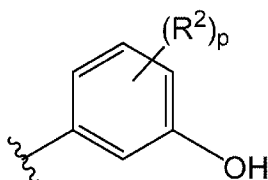
(111-2)

[化13]



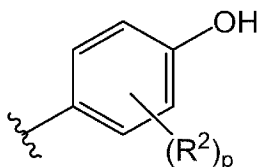
(1V-1)

[化14]



(1V-2)

[化15]



(1V-3)

[0019] 基質において、上記式 (111) で表される構造は、上記式 (111-1) 又は (111-2) のいずれで表される構造であってもよい。

また、基質において、上記式（ⅠⅤ）で表される構造は、上記式（ⅠⅤ－１）、（ⅠⅤ－２）又は（ⅠⅤ－３）のいずれで表される構造であってもよいが、式（ⅠⅤ－３）で表される構造であると好ましい。

[0020] 上記式（ⅠⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ－１）及び（ⅠⅠⅠ－２）において、 R^1 は水素原子又は任意の置換基である。当該任意の置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アミノ基、アミド基、アジド基、メルカプト基（チオール基）、スルホ基、ハロゲン基、及びヘテロアリール基が挙げられる。当該任意の置換基における炭素原子の数は特に限定されず、例えば０以上２０以下、好ましくは０以上１０以下である。

上記式（ⅠⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ－１）及び（ⅠⅠⅠ－２）の R^1 における置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基が好ましく、ここで、炭化水素基の炭素数としては、１以上１０以下であると好ましく、１以上５以下であるとより好ましく、１以上３以下であると更に好ましい。また、当該飽和又は不飽和の炭化水素基は、アルキル基であると好ましい。

上記式（ⅠⅠⅠ）、（ⅠⅠⅠ－１）及び（ⅠⅠⅠ－２）における R^1 の好ましい態様としては、水素原子及び炭素数１～３のアルキル基が挙げられ、より好ましい態様としては、水素原子及びメチル基が挙げられる。

[0021] 上記式（ⅠⅤ）、（ⅠⅤ－１）、（ⅠⅤ－２）及び（ⅠⅤ－３）において、 R^2 はそれぞれ独立して任意の置換基である。当該任意の置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アミノ基、アミド基、アジド基、メルカプト基（チオール基）、スルホ基、ハロゲン基、及びヘテロアリール基が挙げられる。当該任意の置換基における炭素原子の数は特に限定されず、例えば０以上２０以下、好ましくは０以上１０以下である。

上記式（ⅠⅤ）、（ⅠⅤ－１）、（ⅠⅤ－２）及び（ⅠⅤ－３）の R^2 における置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基が好ましく、ここで、炭化水素基の炭素数としては、１以上１０以下であると好ましく、１以上５以

下であるより好ましく、1以上3以下であると更に好ましい。また、当該飽和又は不飽和の炭化水素基は、アルキル基であると好ましい。

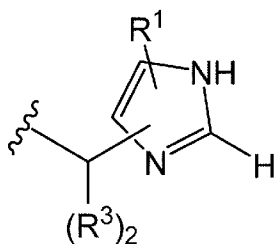
上記式(ⅠⅤ)、(ⅠⅤ-1)、(ⅠⅤ-2)及び(ⅠⅤ-3)において、 R^2 が複数ある場合、複数の R^2 は同一であってもよく、異なってもよい。

[0022] 上記式(ⅠⅤ)、(ⅠⅤ-1)、(ⅠⅤ-2)及び(ⅠⅤ-3)において、 p は0～4(両端値を含む。本明細書中、「～」により表される数値範囲において、同様である。)の整数を示す。 p が0である場合、上記式(ⅠⅤ)、(ⅠⅤ-1)、(ⅠⅤ-2)及び(ⅠⅤ-3)におけるベンゼン環は置換基 R^2 を有さず、式中のベンゼン環における波線で表される結合部位及びヒドロキシ基以外の部分は、水素原子である。

上記式(ⅠⅤ)、(ⅠⅤ-1)、(ⅠⅤ-2)及び(ⅠⅤ-3)において、 p は、好ましくは0～3であり、より好ましくは0～2であり、更に好ましくは0又は1であり、更により好ましくは0である。

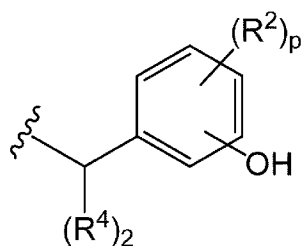
[0023] 基質は、下記式(ⅠⅠⅠ')又は(ⅠⅤ')で表される構造を少なくとも1つ有する化合物であると好ましい。

[化16]



(ⅠⅠⅠ')

[化17]



(ⅠⅤ')

上記式(ⅠⅠⅠ')中、 R^1 は上記式(ⅠⅠⅠ)における R^1 と同義であり、 R^3 はそれぞれ独立して、水素原子又は任意の置換基であり、上記式(ⅠⅤ

') 中、 R^2 及び p は上記式 (I V) における R^2 及び p と同義であり、 R^4 はそれぞれ独立して、水素原子又は任意の置換基である。

[0024] 上記式 (I I I') で表される構造において、 R^1 のイミダゾール環における結合位置は特に限定されず、すなわち、上記式 (I I I') で表される構造は、上記式 (I I I) における上記式 (I I I-1) 及び (I I I-2) に対応する構造をとり得る。

上記式 (I V') で表される構造において、ヒドロキシ基のベンゼン環における結合位置は、オルト位、メタ位、又はパラ位のいずれであってもよく、すなわち、上記式 (I V') で表される構造は、上記式 (I V) で表される構造における上記式 (I V-1)、(I V-2) 及び (I V-3) に対応する構造をとり得る。上記式 (I V') で表される構造において、ヒドロキシ基のベンゼン環における結合位置は、パラ位であると好ましい。

[0025] 上記式 (I I I') における R^1 の例示及び好ましい態様等 (好ましい、より好ましい、更に好ましい、更により好ましいなどとして記載される態様。以下、本明細書中において同様である。) は、上記式 (I I I) における R^1 と同様である。また、上記式 (I V') における R^2 及び p の例示及び好ましい態様等は、上記式 (I V) における R^2 及び p と同様である。

上記式 (I I I') における R^3 及び上記式 (I V') における R^4 はそれぞれ独立して、水素原子又は任意の置換基である。当該任意の置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アミノ基、アミド基、アジド基、メルカプト基 (チオール基)、スルホ基、ハロゲン基、及びヘテロアリール基が挙げられる。当該任意の置換基における炭素原子の数は特に限定されず、例えば 0 以上 20 以下、好ましくは 0 以上 10 以下である。2 つの R^3 及び 2 つの R^4 において、各 R^3 及び R^4 は同一であってもよく、異なってもよい。

上記式 (I I I') の R^3 及び上記式 (I V') における R^4 における置換基としては、飽和又は不飽和の炭化水素基が好ましく、ここで、炭化水素基の炭素数としては、1 以上 10 以下であると好ましく、1 以上 5 以下である

とより好ましく、1以上3以下であると更に好ましい。また、当該飽和又は不飽和の炭化水素基は、アルキル基であると好ましい。

上記式 (I I I') における R^3 及び上記式 (I V') における R^4 の好ましい態様としては、水素原子及び炭素数1～3のアルキル基が挙げられ、より好ましい態様としては、水素原子及びメチル基が挙げられる。

上記式 (I I I') における2つの R^3 は同一であってもよく、異なってもよい。上記式 (I V') における2つの R^4 は同一であってもよく、異なってもよい。

[0026] 基質の好ましい態様としては、上記式 (I I I') において R^1 が水素原子、メチル基又はエチル基であり、2つの R^3 が水素原子である構造を少なくとも1つ有する化合物が挙げられる。また、基質の好ましい態様としては、上記式 (I V') において p が0であり、2つの R^4 が水素原子であり、ヒドロキシ基がパラ位に結合している構造を少なくとも1つ有する化合物が挙げられる。

[0027] プレニル化工程における基質は、上記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも1つ有する化合物であれば特に限定されず、ペプチド又はタンパク質であってよく、それ以外の化合物であってもよい。基質は、典型的には、ペプチド、タンパク質、又は低分子化合物（アミノ酸モノマー誘導体を含む。）である。本明細書中、「低分子化合物」とは、分子量が1000以下の化合物を意味する。

基質は、上記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造の周囲環境がプレニル基転移酵素と相互作用し得る環境となるように構成されていることが好ましい。

[0028] プレニル化工程における基質は、好ましくは上記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも1つ有するペプチド又はタンパク質である。本明細書中、「ペプチド」は、2～50のアミノ酸がペプチド結合により結合している化合物を意味し、「タンパク質」は、51以上のアミノ酸がペプチド結合により結合している化合物を意味する。また、本明細書中、「ペプ

チド又はタンパク質」は、2以上のアミノ酸がペプチド結合により結合している化合物を意味し、結合しているアミノ酸の個数は特に限定されない。

[0029] 本明細書において、「アミノ酸」は、その最も広い意味で用いられ、天然アミノ酸に加え、人工のアミノ酸変異体や誘導体を含む。また、本明細書において、用語「アミノ酸」は、タンパク質性アミノ酸 (proteinogenic amino acids)、及び非タンパク質性アミノ酸 (non-proteinogenic amino acids) を包含する。

タンパク質性アミノ酸 (proteinogenic amino acids) は、当業界に周知の3文字表記により表すと、A r g、H i s、L y s、A s p、G l u、S e r、T h r、A s n、G l n、C y s、G l y、P r o、A l a、I l e、L e u、M e t、P h e、T r p、T y r、及びV a lである。また、タンパク質性アミノ酸は、当業界に周知の1文字表記により表すと、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、C、G、P、A、I、L、M、F、W、Y、及びVである。

非タンパク質性アミノ酸 (non-proteinogenic amino acids) としては、タンパク質性アミノ酸以外の天然又は非天然のアミノ酸を意味する。

[0030] アミノ酸又はその誘導体としては、天然タンパク質性L-アミノ酸；非天然アミノ酸；及びアミノ酸の性質として当業界で公知の性質を有する化学的に合成された化合物等が挙げられる。

非天然アミノ酸の例としては、主鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸、例えば α 、 α -二置換アミノ酸 (α -メチルアラニン等)、N-アルキル- α -アミノ酸、D-アミノ酸、 β -アミノ酸、及び α -ヒドロキシ酸；側鎖の構造が天然型と異なるアミノ酸 (ノルロイシン、及びホモヒスチジン等)；側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸 (「ホモ」アミノ酸、ホモフェニルアラニン、及びホモヒスチジン等)；並びに、側鎖中のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されているアミノ酸 (システイン酸等) が挙げられるが、これらに限定されない。非天然アミノ酸の具体例としては、国際公開第2015/030014号に記載のアミノ酸が挙げられる。

また、アミノ酸の誘導体は、後述する保護基により保護されている形態を含む。

[0031] 基質がペプチド又はタンパク質である場合、基質を形成するアミノ酸の個数は特に限定されず、例えば2以上2000以下であってよい。基質を形成するアミノ酸の個数は上記の範囲において、3以上、4以上、5以上、6以上、又は10以上であってよく、1500以下、1000以下、800以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、55以下、50以下、45以下、40以下、30以下、又は20以下であってよい。基質を形成するアミノ酸の個数は例えば2以上600以下であってよく、2以上300以下であってよく、2以上80以下であってよく、2以上60以下であってよい。基質を形成するアミノ酸の個数は上記の範囲内において、上記の上限値及び下限値を任意に組み合わせて得られる範囲内としてもよい。

[0032] 基質がペプチド又はタンパク質である場合、その一次構造は特に限定されず、例えば直鎖状であってもよく、環状部分を含んでいてもよい。基質であるペプチド又はタンパク質は、環状構造に直鎖のペプチドが尾のように付いた「投げ縄型」であってもよい。また、基質はペプチド又はタンパク質以外の構造を有していてもよい。基質は、標的結合性及び／又は細胞膜透過性及び／又はバイオアベイラビリティが高まる観点から、環状ペプチドであると好ましい。

本明細書において、ペプチド又はタンパク質が「環状構造」又は「環状部分」を有するとは、アミノ酸配列において1アミノ酸残基以上離れた2つのアミノ酸が、直接、又はリンカー等を介して結合することによって形成される閉環構造を有することを意味する。

[0033] 基質が環状構造を含むペプチド又はタンパク質である場合、環状構造における閉環構造は特に限定されず、2つのアミノ酸が必要に応じてリンカー等を介して共有結合していればよい。

2つのアミノ酸間の共有結合としては、例えば、ジスルフィド結合、ペプ

チド結合、アルキル結合、アルケニル結合、エステル結合、チオエステル結合、エーテル結合、チオエーテル結合、ホスホネートエーテル結合、アゾ結合、C-S-C結合、C-N-C結合、C=N-C結合、アミド結合、ラクタム架橋、カルバモイル結合、尿素結合、チオ尿素結合、アミン結合、及びチオアミド結合等が挙げられる。また、閉環構造は、 $N-CO-CH_2-S$ 構造、又はその他後述する表4に示す官能基1を有するアミノ酸と対応する官能基2を有するアミノ酸とにより形成される構造であってもよい。

また、2つのアミノ酸間の共有結合は、2つのアミノ酸の側鎖同士、2つのアミノ酸の主鎖同士、又は、2つのアミノ酸の側鎖と主鎖との結合等により形成されてもよい。2つのアミノ酸がアミノ酸の主鎖において結合する場合、典型的にはペプチド結合により閉環構造が形成される。

[0034] ペプチド又はタンパク質に含まれ得る環状構造は、直鎖状ペプチドのN末端アミノ酸とC末端アミノ酸との結合に限られず、末端のアミノ酸と末端以外のアミノ酸との結合、又は末端以外のアミノ酸同士の結合により形成されてもよい。環状構造形成のために結合するアミノ酸の一方が末端アミノ酸で、他方が非末端アミノ酸である場合、環状ペプチドは、投げ縄型の構造を有する。

ペプチド又はタンパク質が投げ縄型である場合、環状構造を構成するアミノ酸のC末端に直鎖のペプチドが結合していることが好ましい。言い換えれば、直鎖状ペプチドにおけるN末端アミノ酸とC末端以外のアミノ酸の側鎖とが結合して環状構造を形成することが好ましい。

ペプチド又はタンパク質の環状構造を形成するアミノ酸残基の数は3以上であれば特に限定されないが、例えば、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、又は10以上であってもよく、60以下、50以下、40以下、30以下、25以下、20以下、18以下、又は15以下であってもよい。

基質が環状構造を含むペプチド（本明細書中、「環状ペプチド」ともいう。）である場合、環状構造を形成するアミノ酸の数は、通常3以上40以下

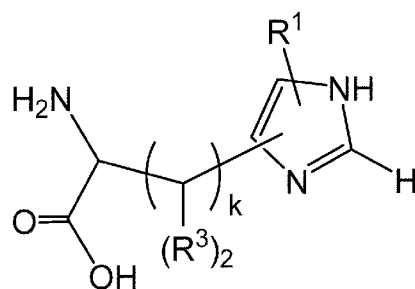
である。環状構造を形成するアミノ酸の数は、上記範囲内で、4以上、5以上、8以上、又は10以上であってもよく、30以下、25以下、20以下、又は18以下としてもよい。

プレニル化工程における基質の好ましい一態様は、例えば少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有する環状ペプチドであり、環状構造を形成するアミノ酸の数は好ましくは3以上30以下、より好ましくは4以上20以下である。

[0035] 上記式(III)又は(IV)で表される構造を少なくとも1つ有するペプチド又はタンパク質としては、少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質が挙げられる。

[0036] 本明細書において、Hisの誘導体としては、以下の構造：

[化18]



(V)

を有する誘導体；その誘導体及びHisのβ-アミノ酸、γ-アミノ酸、及びδ-アミノ酸に対応する誘導体；並びに、それら誘導体のα-アルキル-アミノ酸（例えば炭素数1～3のアルキル基を有するα-アルキル-アミノ酸であり、典型的にはα-メチル-アミノ酸である。）に対応する誘導体が挙げられる。

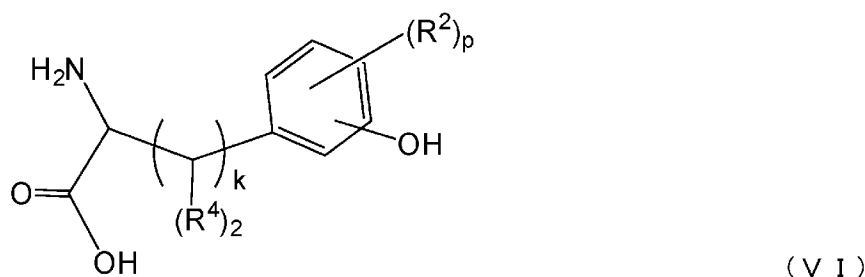
上記式(V)中、R¹及びR³は上記式(III')におけるR¹及びR³とそれぞれ同義であり、kは0～3の整数を示す。

上記式(V)中、R¹は好ましくは水素原子又は炭素数1～3のアルキル基であり、より好ましくは水素原子又はメチル基であり；R³はそれぞれ独立して、好ましくは水素原子又は炭素数1～3のアルキル基であり、より好まし

くは水素原子又はメチル基であり、更に好ましくは水素原子であり；kは好ましくは1又は2を示す。なお、kが2である場合、上記式（V）はホモアミノ酸に対応する。ただし、Hisの誘導体としては、Hisと同一の構造を有するものを除く。

[0037] 本明細書において、Tyrの誘導体としては、以下の構造：

[化19]



を有する誘導体；その誘導体及びTyrのβ-アミノ酸、γ-アミノ酸、及びδ-アミノ酸に対応する誘導体；並びに、それら誘導体のα-アルキル-アミノ酸（例えば炭素数1～3のアルキル基を有するα-アルキル-アミノ酸であり、典型的にはα-メチル-アミノ酸である。）に対応する誘導体が挙げられる。

上記式（V1）中、R²、R⁴及びpは上記式（IV'）におけるR²、R⁴及びpとそれぞれ同義である。

上記式（V1）中、R²はそれぞれ独立して、好ましくは炭素数1～3のアルキル基であり、より好ましくはメチル基であり；pは好ましくは0～2、より好ましくは0又は1、更に好ましくは0であり；R⁴はそれぞれ独立して、好ましくは水素原子又は炭素数1～3のアルキル基であり、より好ましくは水素原子又はメチル基であり、更に好ましくは水素原子であり；ベンゼン環におけるヒドロキシ基は好ましくはパラ位に位置し；kは好ましくは1又は2を示す。なお、kが2である場合、上記式（V1）はホモアミノ酸に対応する。ただし、Tyrの誘導体としては、Tyrと同一の構造を有するものを除く。

[0038] なお、ペプチド又はタンパク質において、His、Tyr、又はこれらの

誘導体は、L体であってもよく、D体であってもよい。また、H i s及びT y rの誘導体は、それぞれH i s及びその誘導体、並びにT y r及びその誘導体が後述する保護基により保護されている形態も含むものとする。

[0039] 基質である少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質において、H i s、T y r、又はこれらの誘導体の個数は特に限定されない。H i s、T y r、又はこれらの誘導体の個数は1以上10以下であってよく、上記範囲において、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、又は3以下であってよく、1以上、2以上、3以上、又は4以上であってもよい。

ペプチド又はタンパク質は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体のうち、H i s又はその誘導体のみを含んでいてもよく、T y r又はその誘導体のみを含んでいてもよく、H i s又はその誘導体とT y r又はその誘導体の両方を含んでいてもよい。

[0040] プレニル化工程における基質が、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質である場合、H i s、T y r、又はこれらの誘導体の前後配列は特に限定されない。

基質であるペプチド又はタンパク質において、H i s、T y r、又はこれらの誘導体に隣接するN末端側のアミノ酸は、存在しないか、L y s及びA r g並びにそれらの誘導体（ただし、側鎖において正電荷を有するものに限る。）以外のアミノ酸であることが好ましく；存在しないか、中性アミノ酸又は立体障害が小さいアミノ酸であることがより好ましく；存在しないか、中性アミノ酸であることが更に好ましく；存在しないか、中性かつ立体障害が小さいアミノ酸であることが更に好ましい。すなわち、ペプチド又はタンパク質は、（1）X a a 1－X a a 2で表される部分構造を有するか、（2）N末端にH i s、T y r、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有すると好ましい。ここで、X a a 1は、L y s及びA r g以外のアミノ酸であり、L y s及びA r g並びにそれらの誘導体（ただし、側鎖において

正電荷を有するものに限る。) 以外のアミノ酸であることが好ましく、中性アミノ酸又は立体障害が小さいアミノ酸であることがより好ましく、中性アミノ酸であることが更に好ましく、中性かつ立体障害が小さいアミノ酸であることが更に好ましい。また、X a a 2 は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体である。

[0041] 基質としてのペプチド又はタンパク質において、H i s、T y r、又はこれらの誘導体に隣接するC末端側のアミノ酸は、存在しないか、P r o及びその誘導体（ただし側鎖がアミノ基の窒素原子に結合して環を形成しているものに限る。） 以外のアミノ酸であることが好ましく；存在しないか、側鎖がアミノ基の窒素原子に結合して環を形成しているアミノ酸以外であることがより好ましい。すなわち、ペプチド又はタンパク質は、（1）X a a 2－X a a 3で表される部分構造を有するか、（2）C末端にH i s、T y r、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有すると好ましい。ここで、X a a 2 は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体である。また、X a a 3 は、P r o以外のアミノ酸であり、P r o及びその誘導体（ただし側鎖がアミノ基の窒素原子に結合して環を形成しているものに限る。） 以外のアミノ酸であることが好ましく、側鎖がアミノ基の窒素原子に結合して環を形成しているアミノ酸以外であることがより好ましい。

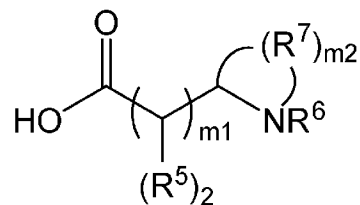
[0042] 本明細書において、「中性アミノ酸」とは、塩基性又は酸性を示す側鎖を分子内に持たないアミノ酸を意味し、タンパク質性アミノ酸で例示すれば、G l y、A l a、P h e、L e u、I l e、C y c、M e t、T y r、V a l、T h r、S e r、P r o、T r p、A s n、及びG l n等が挙げられる。

また、「立体障害が小さいアミノ酸」とは、側鎖の立体障害が小さいアミノ酸を意味し、例えば側鎖を構成する水素原子以外の原子の個数が4以下であるアミノ酸が挙げられる。タンパク質性アミノ酸で例示すれば、G l y、A l a、S e r、P r o、V a l、T h r、C y s、L e u、I l e、A s n、A s p、及びM e t等である。

また、「中性かつ立体障害が小さいアミノ酸」とは、上記の定義において中性アミノ酸及び立体障害が小さいアミノ酸に該当するアミノ酸を意味し、タンパク質性アミノ酸で例示すれば、Gly、Ala、Ser、Pro、Val、Thr、Cys、Leu、Ile、Asn、及びMet等である。

また、「側鎖がアミノ基の窒素原子に結合して環を形成しているアミノ酸」とは、例えば以下のような構造：

[化20]



を有するアミノ酸（ R^5 及び R^6 は、それぞれ独立して水素原子又は任意の置換基であり、 R^7 はそれぞれ独立して任意の2価の基（典型的にはメチレン基）であり、 $m1$ は0以上の整数を示し、 $m2$ は1以上の整数を示す。 $m1$ は典型的には0又は1である。）であり、タンパク質性アミノ酸で例示すれば、Proが挙げられる。

[0043] ペプチド又はタンパク質においてHis、Tyr、又はこれらの誘導体に隣接するN末端側のアミノ酸が存在する場合、好ましいタンパク質性アミノ酸としては、Thr、Ala、Met、Pro、Ser、Val、Ile、Leu、Gly、Asn、Asp、His、Gln、Glu、Phe、Cys、Trp、及びTyrが挙げられ、より好ましくはThr、Ala、Met、Pro、Ser、Val、Ile、Leu、Gly、Glu、Asp、His、Gln、及びAsnであり、更に好ましくはThr、Ala、Gly、Ser、Val、Leu、Asn、Met、Pro、及びIleである。

ペプチド又はタンパク質においてHis、Tyr、又はこれらの誘導体に隣接するC末端側のアミノ酸が存在する場合、好ましいタンパク質性アミノ酸としては、Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Cys、Gly、Ala、Ile、Leu、Met、Ph

e、T r p、T y r、及びV a lが挙げられる。

[0044] プレニル化工程における基質は、ペプチド又はタンパク質において、リン酸化、メチル化、アセチル化、アデニル化、A D P リボシル化、糖鎖付加、及びポリエチレングリコールの付加等の修飾が加えられたものであってもよく、2種以上のペプチド及び／又はタンパク質が直接、又はリンカー等を介して融合したものであってもよい。また、ペプチド又はタンパク質は、リンカー等を介してビオチン化されていてもよい。

[0045] また、基質は、ペプチド又はタンパク質にアミノ酸以外の構造が共有結合又は非共有結合により結合した化合物であってよい。ペプチド又はタンパク質にアミノ酸以外の構造が結合した化合物としては、例えばペプチド又はタンパク質に、直接又はリンカーを介して当該ペプチド又はタンパク質の遺伝子型である核酸分子が結合した化合物、及び、ペプチド又はタンパク質に、直接又はリンカーを介して当該ペプチド又はタンパク質を検出するための標識（蛍光物質、放射性物質、金属ナノ粒子、量子ドット、及び酵素等）が結合した化合物等が挙げられる。

ペプチド又はタンパク質に結合するリンカーとしては、特に限定されず、ペプチド合成分野においてペプチド同士を繋ぐリンカー等として周知の構造のものを採用することができる。

[0046] プレニル化工程における基質は、ペプチド又はタンパク質に該当しない化合物であってもよく、そのような化合物の好ましい態様としては、上記式（I I I）又は（I V）で表される構造を少なくとも1つ有する低分子化合物が挙げられる。そのような低分子化合物としては、例えばH i s、T y r、又はこれらの誘導体の単体が挙げられる。

H i sの誘導体、及びT y rの誘導体としては上記したものが挙げられる。

H i s、T y r、又はこれらの誘導体は、L体であってもよく、D体であってもよい。また、H i s、T y r、又はこれらの誘導体は、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、又は δ -アミノ酸のいずれであってもよい。

が、好ましくは α -アミノ酸である。

[0047] プレニル化工程における基質は、H i s、T y r、又はこれらの誘導体の単体において、アミノ基、カルボキシ基、及び側鎖の官能基のうちの少なくとも1箇所が保護基により保護されているものであってもよい。保護基としては、当業界において一般的に用いられているものであれば特に限定されない。

アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジルオキシカルボニル (C b z) 基、t e r t -ブトキシカルボニル (B o c) 基、フルオレニルメトキシカルボニル (F m o c) 基、ベンジル基、アリル基、及びアリルオキシカルボニル (A l l o c) 基等が挙げられる。

カルボキシ基の保護基としては、例えば、メチル基、エチル基、ベンジル基、t e r t -ブチル基、及びシクロヘキシル基等が挙げられる。

アミノ酸のその他の官能基については、例えばセリン及びトレオニン等のヒドロキシ基の保護基としては、例えばベンジル基及びt e r t -ブチル基等が挙げられ、チロシンのヒドロキシ基の保護基としては、例えば2-ブロモベンジルオキシカルボニル基及びt e r t -ブチル基等が挙げられる。

保護基については、Protective Groups In Organic Synthesis Second Edition by T.W.Greene and P.G.M.Wuts John Wiley&Sons, Inc.に記載されている方法又はそれに準ずる方法に従って、保護及び脱保護を行うことができる。

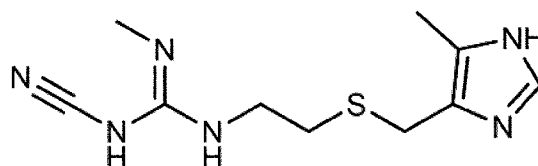
H i s、T y r、又はこれらの誘導体の単体は、アミノ基のみ、カルボキシ基のみ、又はそれ以外の側鎖における官能基のみが保護基により保護されているものであってもよいし、アミノ基、カルボキシ基、及びそれ以外の側鎖における官能基の2種以上又は全てが保護基により保護されているものであってもよい。H i s、T y r、又はこれらの誘導体の単体は、例えばアミノ基がF m o cにより保護されているものであってもよい。

[0048] H i s、T y r、又はこれらの誘導体の単体以外の低分子化合物としては、上記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも1つ有する低

分子化合物であれば特に限定されないが、例えば既に薬理活性が見出されている化合物であると好ましい。そのような化合物を基質として、本実施形態の方法によりプレニル化化合物を製造することにより、既に見出されている薬理活性を高めたり、細胞膜親和性及び／又は細胞膜透過性及び／又はバイオアベイラビリティを向上させたりすることができる。

そのような低分子化合物としては、例えば以下に示す構造を有するシメチジンが挙げられる。

[化21]



[0049] その他、基質であり得る低分子化合物としては、以下の構造を有する化合物が挙げられる。

[化22]



上記構造中、 R^8 は、ヘテロ原子を含んでもよい2価の炭化水素基であり、 R^9 は水素原子又は任意の置換基であり、 X は任意の原子団である。

上記構造中、 R^8 は炭素数が1～15であることが好ましく、1～10であることがより好ましい。 R^8 が含み得るヘテロ原子は、特に限定されず、例えば窒素原子、硫黄原子、及び酸素原子である。

上記構造中、 R^9 は水素原子又は任意の置換基である。当該任意の置換基としては、例えば飽和又は不飽和の炭化水素基、ヒドロキシ基、アルコキシ基、カルボキシ基、アルデヒド基、アミノ基、アミド基、アジド基、メルカプト基（チオール基）、スルホ基、ハロゲン基、及びヘテロアリール基等が挙げられる。当該任意の置換基における炭素原子の数は特に限定されず、例えば0以上20以下、好ましくは0以上10以下である。 R^9 における置換基と

しては、飽和又は不飽和の炭化水素基が好ましく、ここで、炭化水素基の炭素数としては、1以上10以下であると好ましく、1以上5以下であるとより好ましく、1以上3以下であると更に好ましい。また、当該飽和又は不飽和の炭化水素基は、アルキル基であると好ましい。R⁹の好ましい態様としては、水素原子及び炭素数1～3のアルキル基が挙げられ、より好ましい態様としては、水素原子及びメチル基が挙げられる。

上記構造中、Xは任意の原子団である。Xに含まれる原子の個数は特に限定されず、例えば1以上20以下、又は2以上10以下であってよい。Xに含まれる原子の種類も特に限定されず、例えば炭素原子、水素原子、窒素原子、酸素原子、硫黄原子、及びリン原子の少なくとも1種が含まれていてよい。原子団Xは、上記式で表される化合物の薬理活性に主に寄与する部分であってよい。

[0050] 上記の基質は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせるプレニル化工程に供してよい。

また、基質は、上記したいずれかの化合物の薬理学的に許容可能な塩の形態であってよい。

本明細書中、「薬理学的に許容可能な塩」とは、例えば、医薬として許容される塩基や酸との塩を含むものである。

薬理学的に許容可能な塩の非限定的な具体例としては、無機酸（塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸等）の付加塩、有機酸（p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-ブロモフェニルスルホン酸、カルボン酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸等）の付加塩、無機塩基（水酸化アンモニウム又はアルカリ若しくはアルカリ土類金属水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩等）の付加塩、及びアミノ酸の付加塩等が挙げられる。

[0051] （プレニル基転移酵素）

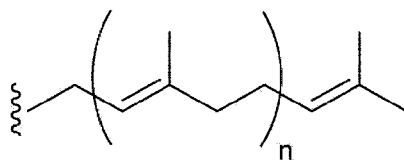
プレニル化工程は、上記の基質のいずれかをプレニル基転移酵素（プレニルトランスフェラーゼ；P T a s e）に接触させる工程であり、当該プレニル基転移酵素は、L i m F又はそれと相同性を有する酵素である。

本発明者らは、後述の実施例に記載のとおり、LimF及びそれと相同性を有する酵素が、上記の任意の基質をプレニル化することができ、多様な基質のプレニル化を触媒できることを見出した。また、LimF及びそれと相同性を有する酵素が、新規なC-プレニル化を触媒する新規なプレニル基転移酵素であることを見出した。

[0052] LimFは、Limnotherix sp. CACIAM 69dに由来するプレニル基転移酵素であり、配列番号1のアミノ酸配列（後述の表1に記載される。）を有する酵素である。

本明細書において「プレニル基転移酵素」とは、基質に対して、炭素数5のイソプレン単位で構成されるプレニル基を結合することができる酵素を意味する。本明細書中、「プレニル基」は、以下の構造：

[化23]



で表される1価の置換基の総称であり、上記式中、 n は0～11の整数を示す。上記式中、 n が0、1、2、3、4、5、7、及び9である場合、上記式で表される基は、それぞれジメチルアリル基、ゲラニル基、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基とも称される。また、その炭素数 n に応じて C_n プレニル基と称することもある。例えば、ジメチルアリル基、ゲラニル基、及びファルネシル基は、それぞれ C_5 プレニル基、 C_{10} プレニル基、及び C_{15} プレニル基とも称す。したがって、本明細書中、特に特定の基について言及される場合を除いて、「プレニル基」との用語は、ジメチルアリル基、ゲラニル基、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基等を包含すると理解される。

[0053] LimFと相同性を有する酵素としては、特に限定されないが、例えば、

C l u s t a l W, M E G A 7ソフトウェアによる解析を用いてシーケンスアラインメントを作成し、系統樹解析の結果、L i m Fのアミノ酸配列と相同性が見られたアミノ酸配列を有するタンパク質を好適に用いることができる。解析の結果相同性が見られたアミノ酸配列を有するタンパク質には、h y p o t h e t i c a l p r o t e i nとアノテーションされたタンパク質も含まれる。

L i m Fと相同性を有する酵素としては、L i m Fのアミノ酸配列（配列番号1）において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列を有する酵素に加えて、例えばL i m Fのアミノ酸配列（配列番号1）に対して少なくとも30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、92%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、プレニル基転移活性を有する酵素が挙げられる。

そのようなL i m Fと相同性を有する酵素としては、例えば以下の表1（表1-1及び1-2として示す。）に示す配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素が挙げられる。配列番号2～12のアミノ酸配列を有する酵素は、実施例に記載の系統樹解析及び配列類似性ネットワーク（sequence similarity network）解析の結果、特にL i m Fと高い相同性を有し、L i m Fと同様のプレニル基転移活性を有すると予測された酵素である。

なお、表1中、配列番号1で表されるアミノ酸配列は、L i m Fのアミノ酸配列であり、配列番号13はL i m Fの172番目のH i sがL e uに置換されたアミノ酸配列である。

[0054]

[表1-1]

配列番号	備考	アミノ酸配列	Accession	Organism
1	LimF	MKKRKSSKVFKSTIAPEEKLRVYGNHKQAFDIEPLYPALFEEFVATTGDCIECSGKIKQDQLYPARIDLQFSDKHIFHNHTSIDFLKRAASRTDVNLNLDILATFLAGNFYSKVQNILAGIDLRQNLGESKILFRIGDYPAKMAVAKHLNITPESEAMLRSDTLHGFDYILDGRSAIELYPELKKDEFNHPFIYNQKLTLSPEALKPLPLCNLFGIGLSPANEANVLYYHLENIEDFLSYFPINDTARRVHDFYLLQ QEGSRRMWVALSESEMKAGRINNVLNLYYSKAFTSQNP	RFP52075.1	Limothrix sp. CACIAM 69d
2		MNQSRLKLLYIGRHKSADFIDYLYPMDIFEQFVESTGDLGIECSGKIKQDKLYPARFDLQFSDRQYAKNIYASIDFLKRVATRVDSYLDNLLEQFLGNDGFSKQVTVLVGVVDLRLHESRLKFRIGDYPKVKTLAKLCGDSPLQQLRLRYDTLHIGFDNLGDSALIELYPEVKKEEFKQPEVYQKLTEILSLAALKPLAISNLMGIGFSQANEAKVLYYHLENIRDFLNYFPINNVARRVHDFYLLQDGSKKMWVALSEAEELIAGKINNVLNLYYSKAFF	NER99885.1	Symploca sp. SIO1B1
3		MTTLESCKKIYYIGIHKQIFEIKNFYPLDIFDSFVNQIETTSENCSSCKIELDKLYPARFGIGFTLKNLQNLNVVYEFFQKVESRIDVQINYSLIQQFFGENDFNMTEFMVGIDARQELSETKLKIALTKNYPEKIKTAIALNGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSEIELYPYIRNQEFQIFDIQQLRATVLSPPALQQLPICSRCVGLSKANADKVVFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMREM CVAVQEKQLLGGTIEKMNLYYLI	WP_035387793.1	Dolichospermum circinale
4		MTTLLQRGKEIYYIGIHKQIFEIKNFYPLDIFDSFVTQIETTSENCYLESSCKIERDKLYPARFGIGFTLKNLQNLNVVYEFFQKVESRIDVQINYSLIQQFFGEDFDFNMTEFMVGVDARPELAESKLKIALTKDYPEKIKTAEIENGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSEIELYPYIRNQEFQIFDIQQLRATVLLPQSLQFLPICSRCVGLSKANADKVVFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMREM CVAVQEKQLLGGTIEKMNLYYLI	QSV52791.1	Dolichospermum sp. UKL201
5		MKSNKKLYYISAKHKAFFIDNLYPLNLFEFGFVERIEKIEKTENCVLESCKIDHDKLYPVRFNIGFPNNSIKQLHAVMDFFRRVRESRVDVKLNLSLFQQFIGNDFKLDKMTDMLGIDLRDLSDSRLKIGLTIEDYPEKQKAAVILNNIDEVTSNLLISNRLHIGFDLYLNGRSEMEELYPHIMQQQDFQKLDVQQLSKVLSPPALQVVPACTRICVGLSKANRDKIYYYLENMGDFLNYFTVNDTARKVHAYYLLKQPV VEMCVALPESELLAGTTIKNLNLYLL	WP_192846042.1	Microcystis aeruginosa
6		MLKSNKKLYYISAKHKAFFIDNLYPLNLFEFGFVERIEKIEKTENCVLESCKIDHDKLYPVRFNIGFPNNSIKQLHAVMDFFRRVRESRVDVKLNLSLFQQFIGNDFKLDKMTDMLGIDLRDLSDSRLKIGLTIEDYPEKQKAAVILNNIDEVTSNLLISNRLHIGFDLYLNGRSEMEELYPHIMQQQDFQKLDVQQLSKVLSPPALQVVPACTRICVGLSKANRDKIYYYLENMGDFLNYFTVNDTARKVHAYYLLKQPV VEMCVALPESELLAGTTIKNLNLYLL	BCR82584.1	Microcystis aeruginosa

[表1-2]

配列番号	備考	アミノ酸配列	Accession	Organism
7		MTTLQRGKEIYIGIHKQFEIKNFYPLDIFDSFVYQIETTSNENCYLESSCKIERDKLYPARFGIGFTLKNLQKLVVYEFFQKVESRI DVQINYSLIQQFFGEDFDNKMTEFMVGVDAPELAESKLKIALTIKDYPEKIKTAIELNGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSE IELYPYIRNQEFQIFDIQQRRLATVLLPQSLQFLPICSRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMDEM CVAVQEKELGGTIEKMNLYYLI	WP_168465419.1	Aphanizomenon sp. UHCC 0183
8		MTTLQRGKEIYIGIHKQFEIKNFYPLDIFDSFVYQIETTSNENCYLESSCKIERDKLYPARFGIGFTLKNLQKLVVYEFFQKVESRI DVQINYSLIQQFFGEDFDNKMTEFMVGVDAPELAESKLKIALTIKDYPEKIKTAIELNGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSE IELYPYIRNQEFQIFDIQQRRLATVLLPQSLQFLPICSRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMDEM VQEKQLLGGTIEKMNLYYLI	MBO1057683.1	Dolichospermum sp. JUN01
9		MFRIKELQFYVYLESSCKIERDKLYPARFSIGFTLKNLQKLVVYEFFQKVESRIDVQINYSLIQQFFGEDFDNKMTEFMVGVDA PELAESKLKIALTIKDYPEKIKTAIELNGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSEIELYPYIRNQEFQIFDIQQRRLATVLLPQSLQFL CSRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMDEMCAVQEKELGGTIEKMNLYYLI	MBD2277104.1	Aphanizomenon flos-aquae FACHB- 1040
10		MATSESSKNYYISTHKOAFDVENFYPLEIWEKFVEKIEKTSEKCFLESSCKIDQGGQFYAARFGIGFDLQNLQKLVVYEFFQK VESRVGVRVDYSLIKQFLGDDFDNKMTEFLIGVDAARELAESKLKIALTIKDYPEKIKTAIELNGGLDETEKLVVSNLSLHIGFDLSL NGISEIELYPYIGKQDFQIFDIQQRRLATVLLPQSLQFLPICSRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPM SEMCAAPESQFAIEKIEKMNLYYLI	WP_002767616.1	Microcystis aeruginosa
11		MTKKNIRPQQVAPVERETTAKDQSGQVTAQWQIDYPPKIKTAIELNGGLDKNIYNLLVSNLSLHIGFDLSLDGRSEIELYPYIRNQ FOIFDIQQRRLATVLLPQSLQFLPICSRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQQQPMREMCAVQEKQLL GGTIEKMNLYYLI	MBS9395133.1	Dolichospermum sp. OL01
12		MVLLSKNKKLYYISAHKHAFEIDNLYPLNLFEFGEVERIEKIEKTENCVLESSCKIDHDKLYPVFRNIGFPNNISIKQLHAVMIDFFRRVES RYDVKLNLSLQFQIGNDKFLDKMTDLMLGDLRRDLSDSLKIGLTIEDYPEKKAVALNNNDDEVTSNLLSNRLHIGFDLYLNGR SEMELYPHIMQQDFQKLDVQQRSLSKVLSPPALQVYPACITRICVGLSKANADKVYFYLYKNLNDFLNYFTVNDTARRVHAYYQLQP VVEMCVALPESELLAGTTIKNLNLYLI	FXS89939.1	Microcystis aeruginosa NIES-88
13	UimF- H172L	MKKRKSSKVFKSTAPEEKLRYIGNHKQAFDIEPLPLALFEFVATTGQIECSGKIKQDQLYPARIDQFSDKHFFHNIHTSIDFL KRAASRTDVNLNLDILATFLAGNFDFSKVQNLILGDLRQNLGESKLFIRIGDYPAKMAVAKHLNCTPESAMLRSDTLJIGDFY LDGRSAIELYPCLKDEFNHPFYNNQLKTLSPALKPLPLONLFGIGLSPANVLYHLENIEDFLSYFPINDTARRVHDFYLLQ EGSRRMWWALSESEIMKAGRNNVNLYYSKAFSQNP	-	-

[0056] プレニル化工程におけるプレニル基転移酵素は、以下の（１）、（２）又
は（３）に該当するアミノ酸配列を含む酵素を含むことが好ましく、以下の

(1)、(2)又は(3)に該当するアミノ酸配列を有する酵素を含むことがより好ましい。この態様において、これらの酵素はプレニル基転移活性を有することが好ましい。

(1) 上記表1に記載の配列番号1～12のいずれかで表されるアミノ酸配列

(2) 配列番号1～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列

(3) 配列番号1で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列

[0057] 本明細書において、「1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列を有する」という場合、欠失、置換又は付加されるアミノ酸の個数は、結果として得られるプレニル基転移酵素がその機能を保持する限り特に限定されない。また、ここでの「数個」は、2以上の整数を意味し、好ましくは2～15個、より好ましくは2～10個、更に好ましくは2～5個、更により好ましくは2個、3個、又は4個である。各プレニル基転移酵素における欠失、置換又は付加の位置は、結果として得られるプレニル基転移酵素がその機能を保持する限り特に限定されず、各プレニル基転移酵素におけるN末端でも、C末端でも、その中間であってもよい。

また、本明細書において、「配列番号Xで表されるアミノ酸配列とY%以上の相同性を有する」とは、2つのポリペプチドのアミノ酸配列の一致が最大になるように整列（アラインメント）させたときに、共通するアミノ酸残基数の、配列番号Xにおける全アミノ酸数に対する割合が、Y%以上であることを意味する。本明細書において、「Y%以上の相同性」という場合、「Y%以上の同一性」と言い換えることもできる。

[0058] 上記(2)のアミノ酸配列は、配列番号1～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、好ましくは1以上7以下、より好ましくは1以上5以下、更に好ましくは1以上3以下、更により好ましくは1又は2のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列である。

上記（３）のアミノ酸配列は、配列番号１で表されるアミノ酸配列と、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、更に好ましくは９２％以上、更により好ましくは９５％以上、なおも更に好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列である。

[0059] プレニル化工程におけるプレニル基転移酵素は、以下の（４）に該当するアミノ酸配列を含む酵素を含むことも好ましく、以下の（４）に該当するアミノ酸配列を有する酵素を含むことも好ましい。この態様において、これらの酵素はプレニル基転移活性を有することが好ましい。

（４） 配列番号２で表されるアミノ酸配列と８０％以上の相同性を有するアミノ酸配列

[0060] 上記（４）のアミノ酸配列は、配列番号２で表されるアミノ酸配列と、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、更に好ましくは９２％以上、更により好ましくは９５％以上、なおも更に好ましくは９８％以上、特に好ましくは９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列である。

[0061] プレニル基転移酵素は、*Limnothrix* sp. 若しくは *Symploca* sp. に由来するプレニル基転移酵素、又はそれらと相同性を有する酵素を含むことが好ましい。*Limnothrix* sp. 又は *Symploca* sp. に由来するプレニル基転移酵素と相同性を有する酵素としては、特に限定されないが、例えば *Limnothrix* sp. 又は *Symploca* sp. に由来するプレニル基転移酵素のアミノ酸配列（例えば配列番号１又は２で表されるアミノ酸配列）に対して少なくとも４０％以上、５０％以上、６０％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上、９２％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。

[0062] プレニル基転移酵素は、配列番号１で表されるアミノ酸配列、配列番号２で表されるアミノ酸配列、及びこれらのアミノ酸配列において１又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列を有する群より選択されるアミノ酸配列を含む酵素を含むことが好ましい。また、プレニル基転移酵素

は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列、及びこれらのアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素であることが特に好ましい。配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列は、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列であってもよい。

[0063] プレニル化工程の基質が上記式 (I V) で表される構造を有せず、上記式 (I I I) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物である場合において、プレニル基転移酵素が、以下の (2') 又は (3) に該当するアミノ酸配列を含む、又はそれらいずれかのアミノ酸配列を有する酵素を含むとき、それらの酵素において、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 54 番目の G l u 及び 172 番目の H i s は、欠失も置換もされていないことが好ましく、54 番目の G l u、172 番目の H i s、188 番目の T y r、237 番目の T y r、及び 292 番目の T y r が欠損も置換もされていないことがより好ましい。また、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における 70 番目の A s p は、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、A l a に置換されていてもよい。

(2') 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列

(3) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列

[0064] プレニル化工程の基質が上記式 (I V) で表される構造を有せず、上記式 (I I I) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物である場合において、プレニル基転移酵素が、上記の (2) 若しくは (4) に該当するアミノ酸配列を含む、又は (2) 若しくは (4) に該当するアミノ酸配列を有する酵素を含むとき、それらの酵素のアミノ酸配列を配列番号 1 で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号 1 の 54 番目の G l u 及び 172 番目の H i s に対応するアミノ酸は、欠失も置換もされていないことが

好ましく、配列番号1の54番目のG l u、172番目のH i s、188番目のT y r、237番目のT y r、及び292番目のT y rに対応するアミノ酸が欠損も置換もされていないことがより好ましい。また、配列番号1の70番目のA s pに対応するアミノ酸は、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、A l aに置換されていてもよい。

[0065] また、プレニル化工程の基質が(IV)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物である場合において、プレニル基転移酵素が、上記の(2')又は(3)に該当するアミノ酸配列を含む、又はそれらいずれかのアミノ酸配列を有する酵素を含むとき、それらの酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列における54番目のG l uは、欠失も置換もされていないことが好ましく、54番目のG l u、188番目のT y r、237番目のT y r、及び292番目のT y rが欠損も置換もされていないことがより好ましい。この態様において、配列番号1で表されるアミノ酸配列における172番目のH i sは、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、脂肪族残基を有するアミノ酸（例えばL e u、M e t、l l e、又はV a l）に置換されていることが好ましく、L e uに置換されていることがより好ましい。また、配列番号1で表されるアミノ酸配列における70番目のA s pは、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、A l aに置換されていてもよい。

[0066] また、プレニル化工程の基質が(IV)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物である場合において、プレニル基転移酵素が、上記の(2)若しくは(4)に該当するアミノ酸配列を含む、又は(2)若しくは(4)に該当するアミノ酸配列を有する酵素を含むとき、それらの酵素のアミノ酸配列を配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号1の54番目のG l uに対応するアミノ酸は、欠失も置換もされていないことが好ましく、54番目のG l u、188番目のT y r、237番目のT y r、及び292番目のT y rに対応するアミノ酸が欠損も置換もされていないことがより好ましい。また、配列番号1の172番目のH i sに対応す

るアミノ酸は、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、脂肪族残基を有するアミノ酸（例えばL e u、M e t、I l e、又はV a l）に置換されていることが好ましく、L e uに置換されていることがより好ましい。また、配列番号1の70番目のA s pに対応するアミノ酸は、欠失又は置換がされていてもよく、置換されている場合は、A l aに置換されていてもよい。

[0067] また、配列番号1で表されるアミノ酸配列において欠失又は置換がされている場合、欠失又は置換されているアミノ酸は、52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、172番目のH、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWのうちの少なくとも1つであってよい。配列番号1で表されるアミノ酸配列において、54番目のE、188番目のY、237番目のY、及び292番目のY以外のアミノ酸に、さらに1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加していてもよい。

また、配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において欠失又は置換がされている場合、欠失又は置換されているアミノ酸は、当該アミノ酸配列を配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号1の52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、172番目のH、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWに対応するアミノ酸のうちの少なくとも1つであってよい。配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに、54番目のE、188番目のY、237番目のY、及び292番目のYに対応するアミノ酸以外のアミノ酸に、さらに1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加していてもよい。

[0068] 配列番号2～13を配列番号1とアライメントした結果を図14-1及び14-2に示す。図中、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する酵素L i m Fにおいて、プレニル基ドナーが結合する（収容される）サイトに対応

するアミノ酸を矢印で示している。

[0069] 本実施形態の製造方法において、プレニル基転移酵素は、プレニル化する基質及びプレニル基を供与し得る化合物の種類に応じて適宜選択してもよい。

例えば、プレニル化する基質がペプチド又はタンパク質である場合であって、H i s又はその誘導体をプレニル化する場合において、H i s又はその誘導体の、N末端側に隣接するアミノ酸が正電荷を有しているか又は立体障害が大きいときは、配列番号1で表されるアミノ酸配列において52番目のIが置換されたアミノ酸配列、又は配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1の52番目のIに対応するアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を用いてもよい。ここで、当該置換されるアミノ酸は特に限定されないが、例えば立体障害が小さいアミノ酸に置換されてもよく、好ましくはA l aに置換される。

[0070] また、本実施形態の製造方法において基質に導入されるプレニル基がジメチルアリル基である場合、配列番号1で表されるアミノ酸配列において配列番号1の224番目のGが置換されたアミノ酸配列、又は配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1の224番目のGに対応するアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を用いてもよい。ここで、当該置換されるアミノ酸は、例えばG l yよりかさ高いアミノ酸に置換されてもよく、好ましくはC y s、M e t、G l n、L e u、T h r、V a l、又はH i sに置換され、より好ましくはM e t又はH i sに置換され、より好ましくはM e tに置換される。

[0071] また、本実施形態の製造方法において基質に導入されるプレニル基が、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基である場合、特にファルネシル基である場合、配列番号1で表されるアミノ酸

配列において配列番号1の222番目のL若しくは273番目のWが置換されたアミノ酸配列、又は配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1の222番目のL若しくは273番目のWに対応するアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を用いてもよい。ここで、当該273番目のW又は273番目のWに対応するアミノ酸は、例えば中性アミノ酸又は立体障害が小さいアミノ酸に置換されてもよく、好ましくは中性かつ立体障害が小さいアミノ酸に置換され、より好ましくはAsn、Ser、Thr、Val、Ile、Cys、Gly、又はAlaに置換され、さらに好ましくはAsn又はThrに置換される。

配列番号1で表されるアミノ酸配列において配列番号1の273番目のWが置換されたアミノ酸配列、又は配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1の273番目のWに対応するアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を用いる場合、配列番号1の239番目のH、又は配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1の239番目のHに対応するアミノ酸が、さらに置換されていてもよい。ここで、当該置換されるアミノ酸は、例えばGln、Gly、Arg、Val、Cys、又はAlaに置換されてもよく、好ましくはGly又はAlaに置換される。

本実施形態の製造方法において基質に導入されるプレニル基が、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基である場合、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有する酵素のH239G/W237T変異体、及びH239G/W237N変異体、並びに配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに配列番号1で表されるアミノ酸配列のH2

39G/W237T変異、及びH239G/W237N変異に対応する変異を有するアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素のいずれかを用いてもよい。

[0072] また、本実施形態の製造方法において基質に導入されるプレニル基がゲラニル基である場合、(i)配列番号1で表されるアミノ酸配列、(ii)配列番号1で表されるアミノ酸配列において、配列番号1の54番目のE、188番目のY、237番目のY、及び292番目のY以外の1又は数個のアミノ酸；好ましくは54番目のE、172番目のH、188番目のY、237番目のY、及び292番目のY以外の1又は数個のアミノ酸；あるいは52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、172番目のH、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWのうちの少なくとも1つのアミノ酸；より好ましくは52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWのうちの少なくとも1つのアミノ酸が欠失又は置換されたアミノ酸配列、又は(iii)配列番号2～12のいずれかで表されるアミノ酸配列において、配列番号1で表されるアミノ酸配列とアライメントしたときに、配列番号1の54番目のE、188番目のY、237番目のY、及び292番目のY以外の1又は数個のアミノ酸；好ましくは54番目のE、172番目のH、188番目のY、237番目のY、及び292番目のY以外の1又は数個のアミノ酸；あるいは52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、172番目のH、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWのうちの少なくとも1つのアミノ酸；より好ましくは52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、190番目のE、222番目のL、224番目のG、239番目のH、及び273番目のWのうちの少なくとも1つのアミノ酸に対応するアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を用いてもよい。

ここで、52番目のI、70番目のD、72番目のQ、122番目のL、190番目のE、222番目のL、及び239番目のHは、任意のアミノ酸に置換できるが、例えばAlaに置換されてよい。172番目のHは、任意のアミノ酸に置換できるが、例えばLeu、Phe、又はAlaに置換されてよい。224番目のGは、任意のアミノ酸に置換できるが、例えばPhe、又はTyrに置換されてよい。273番目のWは、任意のアミノ酸に置換できるが、例えばAsn、Ser、Thr、Val、Ile、Cys、Phe、Met、Gly、又はAlaに置換されてよい。

[0073] なお、ジメチルアリル基、ゲラニル基、又はファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基（特にファルネシル基）を導入する場合に好ましい酵素として上述した酵素のうち、重複して記載した酵素はいずれの場合においても好ましく用いることができる。例えば、ゲラニル基を導入する場合に好ましい酵素として上述した酵素が、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基（特にファルネシル基）を導入する場合に好ましい酵素としても記載されている場合、当該酵素は、ゲラニル基を導入する場合にも、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基（特にファルネシル基）を導入する場合にも、好ましく用いられる。

[0074] また、プレニル化工程の基質が上記式（I V）で表される構造を有せず、上記式（I I I）で表される構造を少なくとも1つ有する化合物である場合；プレニル化工程の基質が（I V）で表される構造を少なくとも1つ有する化合物である場合；及び、プレニル化する基質がペプチド又はタンパク質である場合であって、His又はその誘導体をプレニル化する場合において、His又はその誘導体の、N末端側に隣接するアミノ酸が正電荷を有しているか又は立体障害が大きいときに、用いることができる、あるいは好ましく

用いられる酵素として上述した酵素において、基質に導入されるプレニル基の種類に応じて、ジメチルアリル基、ゲラニル基、並びにファルネシル基、ゲラニルゲラニル基、ゲラニルファルネシル基、ヘキサプレニル基、オクタプレニル基、及びデカプレニル基のような比較的大きい基（特にファルネシル基）を導入する際に用いられる酵素として上述した酵素において導入される上述した変異を導入してもよい。また、上述した変異に加えて、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加していてもよい。プレニル基転移酵素は、上述した酵素及びその変異体と、少なくとも40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、92%以上、95%以上、98%以上、又は99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む、あるいは有する酵素を含んでいてよい。

本実施形態の製造方法は、プレニル化工程の前に、プレニル化する基質及びプレニル基を供与し得る化合物の種類に応じてプレニル基転移酵素を選択してもよい。

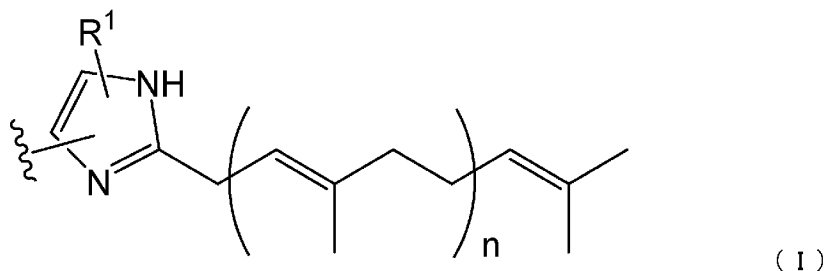
[0075] 上記のプレニル基転移酵素はいずれも、磁気ビーズ等の固相担体に担持させた状態で用いてもよい。したがって、プレニル化工程で用いられるプレニル基転移酵素には、固相担体に担持させた酵素の態様が包含される。さらに、プレニル基転移酵素は、Hisタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、及びマルトース結合タンパク質（MBP）等の付加配列を有していてもよい。

上記のプレニル基転移酵素は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせてプレニル化工程に供してよい。

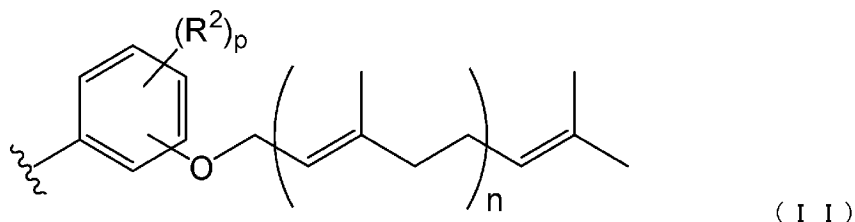
[0076] （プレニル化工程）

プレニル化工程は、上記の基質のいずれか又はその組み合わせを、上記のプレニル基転移酵素のいずれか又はその組み合わせに接触させて、下記式（I）又は（II）で表される構造を少なくとも1つ有する化合物を得る工程である。

[化24]



[化25]



なお、式 (I) 中、 R^1 は水素原子又は任意の置換基であり、 n は 0 ～ 11 の整数を示し、式 (II) 中、 R^2 はそれぞれ独立して、任意の置換基であり、 p は 0 ～ 4 の整数を示し、 n は 0 ～ 11 の整数を示す。

[0077] 上記式 (I) で表される構造において、 R^1 のイミダゾール環における結合位置は特に限定されず、すなわち、上記式 (I) で表される構造は、上記式 (III) における上記式 (III-1) 及び (III-2) に対応する構造を取り得る。

上記式 (II) で表される構造において、酸素原子のベンゼン環における結合位置は、オルト位、メタ位、又はパラ位のいずれであってもよく、すなわち、上記式 (II) で表される構造は、上記式 (IV) で表される構造における上記式 (IV-1)、(IV-2) 及び (IV-3) に対応する構造を取り得る。上記式 (II) で表される構造において、酸素原子のベンゼン環における結合位置は、パラ位であると好ましい。

[0078] 上記式 (I) における R^1 の例示及び好ましい態様等は、上記式 (III) における R^1 と同様である。また、上記式 (II) における R^2 及び p の例示及び好ましい態様等は、上記式 (IV) における R^2 及び p と同様である。

上記式 (I) 及び (II) における n は 0 ～ 11 の整数を示し、使用する後述のプレニル基ドナーの種類等に依存する。上記式 (I) 及び (II) に

おける n は、例えば 0 以上 8 以下であり、0 以上 6 以下、0 以上 5 以下、0 以上 3 以下、0 以上 2 以下、又は 0、1 若しくは 2 であってよい。

[0079] プレニル化工程により得られる化合物は、プレニル化工程に供する基質に対応する。上記のいずれの基質を用いても上記式 (I) 又は (II) の構造を有する化合物が得られるが、その他の上記式 (I) における R^1 、上記式における R^2 及び p 、並びにその他の構造は、使用した基質に対応する構造が得られる。

なお、基質が上記式 (III) 又は (IV) で表される構造を 2 つ以上有する場合、当該構造を有する複数の部分のうち、少なくとも 1 つ以上がプレニル化されればよく、1 つの部分のみがプレニル化されてもよいし、全ての部分がプレニル化されてもよい。

また、基質が上記式 (III) で表される構造及び上記式 (IV) で表される構造の両方を有する場合も同様に、上記式 (III) で表される構造及び上記式 (IV) で表される構造のいずれかがプレニル化されればよく、上記式 (III) で表される構造のみがプレニル化されてもよいし、上記式 (IV) で表される構造のみがプレニル化されてもよいし、上記式 (III) で表される構造及び上記式 (IV) で表される構造の両方がプレニル化されてもよい。

[0080] プレニル化工程は、例えば上記の基質のいずれか又はその組み合わせと、上記のプレニル基転移酵素のいずれか又はその組み合わせと、プレニル基を供与し得る化合物（以下、「プレニル基ドナー」という。）のいずれか又はその組み合わせと、を共存させて適当な反応温度及び反応時間で反応させる工程であってよい。

プレニル基ドナーとしては、プレニル基又はプレニル基に変換され得る官能基を有する化合物であれば特に限定されない。プレニル基ドナーとしては、例えばジメチルアリルニリン酸 (DMA PP)（ジメチルアリルピロリン酸ともいう。以下同様。）、イソプレニルニリン酸 (IPP)、ゲラニルニリン酸 (GPP)、ファルネシルニリン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニルニ

リン酸（GGPP）、及びフィチルニリン酸（PDPP）等のプレニルニリン酸が挙げられる。これらのプレニル基ドナーは、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ、プレニル化工程に供してよい。プレニル基ドナーは、プレニル基転移酵素の種類に合わせて適宜変更してもよい。

[0081] プレニル化工程は、基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナーの全てを溶媒に添加した反応系で行ってもよく、基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナーのいずれかを磁気ビーズ等の固相担体に担持させた反応系に、残りを添加した溶液を接触させることで実施してもよい。

プレニル基転移酵素が溶液中に存在する場合、その濃度は酵素の発現及び精製条件等によって適宜変更すればよく、特に限定されない。プレニル基転移酵素濃度は、例えば0.050 μ M～1.0 mM、又は0.10～500 μ Mであってよい。

基質が溶液中に存在する場合、その濃度は特に限定されないが、例えば0.010 μ M～50 mM、又は0.10 μ M～10 mMであってよい。

プレニル基ドナーが溶液中に存在する場合、その濃度は特に限定されないが、例えば基質の濃度の0.20～100倍、又は1.0～50倍であってよく、具体的には0.010 μ M～100 mM、又は0.10～50 mMであってよい。

[0082] プレニル化工程における反応温度（インキュベート温度）は、特に限定されないが、用いるプレニル基転移酵素の至適温度 $\pm$ 20℃の範囲内であることが好ましい。反応温度は、例えば0～50℃であってよく、好ましくは0～40℃である。

プレニル化工程における反応時間は、反応温度、並びに基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナー等の濃度等によって適宜調整すればよい。反応時間は例えば30分～100時間、1.0～80時間、3.0～50時間、又は5.0～40時間である。

[0083] プレニル化工程は、その反応系において、基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナー以外の成分を含んでいてよい。そのような成分としては

、特に限定されず、例えば基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナーのいずれかの調製に用いた成分、並びにプレニル基転移酵素の触媒活性を高める補因子等が挙げられる。

補因子としては、特に限定されないが、例えば、マグネシウムイオン、銅イオン、鉄イオン、マンガンイオン、モリブデンイオン、ニッケルイオン、セレンイオン、亜鉛イオン等が挙げられる。これらの補因子は1種単独で、又は2種以上が組み合わされて反応系に存在していてもよい。これらの中でもマグネシウムイオンが存在することが好ましい。

プレニル化工程において補因子を用いるか否かは、用いるプレニル基転移酵素の種類等の種々の条件に応じて適宜選択すればよい。

[0084] プレニル化工程の好ましい態様の1つは、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を、上記のいずれかのプレニル基転移酵素のいずれか又はその組み合わせに接触させ、少なくとも1つのH i s残基、T y r残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する工程である。

このような態様によれば、一般的に細胞膜透過性及び／又はバイオアベイラビリティが低い傾向にあるペプチド又はタンパク質に対して、プレニル基を導入することができ、潜在的に有望な薬剤を得ることができる。

[0085] (その他の工程)

本実施形態の化合物の製造方法は、上記のプレニル化工程以外の工程を含んでいてもよい。そのような工程としては、例えば、プレニル化工程に供する基質、プレニル基転移酵素、及びプレニル基ドナーの少なくとも1種を準備する工程、プレニル工程によりプレニル化された化合物を分離・精製する工程、並びに当該精製したプレニル化された化合物の物性を解析する工程等が挙げられる。

[0086] プレニル化工程に供する基質を準備する工程（以下、「基質準備工程」という。）は、上記式（I I I）又は（I V）で表される構造を少なくとも1つ有する化合物を準備する工程である。基質準備工程は、そのような化合物

を従来公知の製造方法で製造する工程であってよく、市販のものを購入し、任意選択的に精製等を経て準備する工程であってもよい。

[0087] 基質準備工程では、上記したような基質を1種又は2種以上準備してよい。基質準備工程により準備される基質の種類が2種以上である場合、基質準備工程は上記式(ⅠⅠⅠ)又は(ⅠⅤ)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物のライブラリーを準備する工程といえる。そのような化合物ライブラリーを用いて本実施形態の化合物の製造方法を実施することにより、上記式(Ⅰ)又は(ⅠⅠ)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物のライブラリーを製造することができる。すなわち、本実施形態の製造方法の一態様は、上記式(Ⅰ)又は(ⅠⅠ)で表される構造を少なくとも1つ有する化合物ライブラリーの製造方法である。

[0088] また、基質準備工程において、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物を2種以上準備する場合、基質準備工程はそのようなペプチド又はタンパク質のライブラリーを準備する工程といえる。そのようなペプチド又はタンパク質ライブラリーを用いて本実施形態の化合物の製造方法を実施することにより、少なくとも1つのH i s残基、T y r残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を有するペプチド又はタンパク質のライブラリーを製造することができる。すなわち、本実施形態の製造方法の一態様は、少なくとも1つのH i s残基、T y r残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を有するペプチド又はタンパク質ライブラリーの製造方法である。ペプチド又はタンパク質ライブラリーの製造方法については、後述する本実施形態のプレニル化合物ライブラリーの製造方法を参照することができる。

[0089] 基質準備工程における基質の製造方法としては、従来公知の化学合成方法を用いてよく、特に基質がペプチド又はタンパク質である場合、翻訳合成系を用いた合成方法を用いてもよい。そのような翻訳合成系としては、細胞翻訳系及び無細胞翻訳系が挙げられる。ペプチド又はタンパク質ライブラリーを製造する場合、ライブラリーの多様性を向上させる等の観点から、無細胞

翻訳系を用いた合成方法を用いることが好ましい。無細胞翻訳系を用いたペプチド又はタンパク質の製造方法については後述する。

[0090] プレニル基転移酵素を準備する工程（以下、「プレニル基転移酵素準備工程」という。）は、上記したようなLimF又はそれと相同性を有する酵素を準備する工程である。プレニル基転移酵素準備工程において、酵素は、自然界に存在する生体（例えば、Limnothrix sp. 及びSymploca sp. 等）から単離してもよく、あるいは、目的酵素をコードする遺伝子を適当な宿主（例えば、大腸菌）内で異種発現させることにより得てもよい。あるいは、無細胞翻訳系や化学合成法により得てもよい。プレニル基転移酵素準備工程では、プレニル化する基質及びプレニル基を供与し得る化合物の種類に応じてプレニル基転移酵素を選択してもよい。

[0091] プレニル化された化合物を分離及び／又は精製する工程（以下、「分離／精製工程」という。）は、本実施形態の製造方法により得られる上記式（I）又は（II）で表される構造を少なくとも1つ有する化合物を原料物質及び／又は副生成物から分離し、及び／又は複数の目的化合物が得られる場合はそれぞれの目的化合物を精製する工程である。分離／精製工程としては、例えば液体クロマトグラフィー等の公知の分離方法を用いてよい。

[0092] 精製したプレニル化された化合物の物性を解析する工程（以下、「解析工程」という。）は、プレニル化工程により得られた目的化合物、あるいは分離／精製工程により単利された目的化合物を解析する工程である。解析工程は、得られた化合物の同定、プレニル化効率の算出、及び所望の標的物質に対する解離定数の測定等を含んでいてよい。具体的には、解析工程は実施例に記載の化合物の解析方法を含んでいてよい。

[0093] [プレニル化化合物ライブラリーの製造方法]

本実施形態の化合物の製造方法において、基質として少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物を2種以上含むライブラリーを用いることで、プレニル化されたペプチド又はタンパク質を含む化合物のライブラリーを製造

することができる。

すなわち、本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法は、プレニル化されたペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーの製造方法であって、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーをプレニル基転移酵素に接触させ、少なくとも1つのH i s 残基、T y r 残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する工程を含み、プレニル基転移酵素は、L i m F 又はそれと相同性を有する酵素である製造方法である。

[0094] 本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法によれば、所定のプレニル基転移酵素を用いて、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体の一部をプレニル化することにより、疎水性の高いペプチド又はタンパク質を含む化合物のライブラリーを製造することができる。また、本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法ではプレニル基転移酵素としてL i m F 又はそれと相同性を有する酵素を用いるため、プレニル基転移酵素の基質許容性が高く、プレニル基を有する多様な化合物を含むライブラリーを製造することができる。以上のとおり、本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法によって、多様な化合物に効率よくプレニル基を導入でき、潜在的に細胞膜親和性及び／又は細胞膜透過性が高い化合物を製造することができる。

[0095] 本明細書中、「化合物ライブラリー」とは、少なくとも2つの化合物を含む化合物群を意味する。本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法により得られる化合物ライブラリーは、少なくとも1つのH i s 残基、T y r 残基、又はこれらの誘導体残基がプレニル化されたペプチド又はタンパク質を含む化合物のライブラリーである。当該ライブラリーに含まれる化合物は、ペプチド又はタンパク質であってよく、あるいはペプチド又はタンパク質にアミノ酸以外の構造が共有結合又は非共有結合により結合した化合物であってよい。ペプチド又はタンパク質にアミノ酸以外の構造が結合した化合物における、ペプチド又はタンパク質以外の部分としては、例えばリンカー、D N A 及びR N A 等の核酸分子、並びにペプチド又はタンパク質を検出するため

の標識（蛍光物質、放射性物質、金属ナノ粒子、量子ドット、及び酵素等）等が挙げられる。

[0096] 本実施形態の化合物ライブラリーの製造方法は、基質として少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物を2種以上含むライブラリーを用いること以外は、上記で詳述した本実施形態の化合物の製造方法と同様に実施することができる。

以下、基質として用いるライブラリーを製造する工程（以下、「ライブラリー調製工程」という。）について詳述する。なお、化合物ライブラリーは、市販のものを購入することにより準備してもよい。

[0097] （ライブラリー調製工程）

ライブラリー調製工程は、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物を2種以上含むライブラリーを調製することができる工程であれば特に限定されない。ライブラリー中の化合物は、固相又は液相の化学合成法によって合成してもよく、翻訳合成系を用いた方法により調製してもよいが、無細胞翻訳系を用いた方法により調製することが好ましい。

[0098] ライブラリー調製工程は、mRNAライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳し、少なくとも1つのH i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーを調製する工程であることが好ましい。

[0099] 本明細書において、「mRNAライブラリー」とは、N1N2N3コドンを複数有するmRNAを2種以上含むmRNA群を意味する。

また、本明細書において、「N1N2N3」は、任意のアミノ酸を指定するコドンを意味し、N1、N2及びN3は、それぞれ独立に、アデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）及びウラシル（U）から選択される。1つのmRNAには、N1N2N3が複数含まれているが、それぞれのN1、N2及びN3はそれぞれ独立に選択される。したがって、例えば、mRNA

Aに、 $-N_1N_2N_3-N_1N_2N_3-$ が含まれる場合、それぞれ2つの N_1 、 N_2 及び N_3 は、互いに同一であっても異なってもよい。

[0100] 以下、便宜的に、mRNAライブラリーを用いてペプチドを含む化合物ライブラリーを調製する工程について説明するが、mRNAライブラリーを用いてタンパク質を含む化合物ライブラリーを調製する工程についても、mRNAの塩基数を調整することにより同様に実施可能である。なお、ライブラリー調製工程は、より好ましくはmRNAライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳し、少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチドを含む化合物ライブラリーを調製する工程である。

[0101] ライブラリー調製工程の一態様において、まず、化合物ライブラリーの各化合物に含まれるペプチドをコードするmRNAを含むmRNAライブラリーを準備する（以下、「mRNA準備工程」という。）。

化合物ライブラリーの各化合物に含まれるペプチドをコードするmRNAの配列は、所望のペプチドのアミノ酸配列に応じて決定する。かかるmRNAライブラリーは、例えばこれをコードするDNAライブラリーを合成し、これを転写することによって調製すればよい。

[0102] mRNA準備工程においては、 $N_1N_2N_3$ コドンに、任意のアミノ酸を再割当てしてよい。再割当てにおいては、天然の遺伝暗号表におけるコドンとアミノ酸との関係とは異なるものを割り当ててよく、同一の関係を割り当ててもよい。

本明細書において、「天然の遺伝暗号表」とは、生体においてmRNAのトリプレットからなる遺伝暗号が表すアミノ酸を示した表をいう。天然の遺伝暗号表において $N_1N_2N_3$ は、以下のアミノ酸をコードする。

[0103]

[表2]

	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

[0104] より具体的に説明すると、mRNA準備工程において、例えば、UUGコドンには上記の天然の遺伝暗号表のとおりLeuを割り当ててもよいし、アミノ酸を再割当することによりLeu以外のアミノ酸を割り当ててもよい。「コドンにアミノ酸を割り当てる」とは、あるコドンがそのアミノ酸をコードするように遺伝暗号表を書き換えることを意味する。本明細書においては、「コドンにアミノ酸を割り当てる」と「コドンを再割当する」とは同義で用いられる。

[0105] 各コドンに対する、天然の遺伝暗号表とは異なるアミノ酸の割り当ては、例えば、人工アミノアシル化RNA触媒フレキシザイム（Flexizyme）を利用したコドン再割当によって実現される。フレキシザイムによれば、任意のアンチコドンを有するtRNAに所望のアミノ酸を結合させることができるため、任意のコドンに任意のアミノ酸を割り当てることが可能となる。フレキシザイムについては、例えばH. Murakami, H. Saito, and H. Sugawara, (2003), Chem. Biol., Vol. 10, 655-662.等に公開される公知のものを用いてよい。

本明細書においては、tRNAにアミノ酸を結合させることを、アミノ酸をtRNAにチャージする、tRNAをアミノアシル化する、又は、アミノ酸でtRNAをアシル化するなどという。

[0106] 各 mRNA における複数の N₁N₂N₃ は、特に限定されず、完全にランダムなものであってよく、例えば複数の N₁N₂K、複数の N₁N₂S、複数の N₁N₂M、複数の N₁N₂W、複数の N₁N₂A、複数の N₁N₂U、複数の N₁N₂C、又は複数の N₁N₂G などのように一部の塩基を特定の塩基に固定したものであってもよい。上記において、N₁ 及び N₂ は N₁N₂N₃ における N₁ 及び N₂ と同義であり、K はそれぞれ独立にウラシル (U) 及びグアニン (G) のいずれかであり、S はそれぞれ独立にシトシン (C) 及びグアニン (G) のいずれかであり、M はそれぞれ独立にアデニン (A) 及びシトシン (C) のいずれかであり、W はそれぞれ独立にアデニン (A) 及びウラシル (U) のいずれかである。

[0107] 以下、便宜的に、mRNA ライブラリーが複数の N₁N₂K を含む mRNA A を含む場合、すなわち mRNA ライブラリーの各 mRNA が N₁N₂K コドンを含む場合を例に挙げて mRNA 準備工程を説明するが、その他の mRNA ライブラリーを用いた場合でも、翻訳された化合物ライブラリーに含まれるペプチドがプレニル化される限りは同様に実施可能である。天然の遺伝暗号表において N₁N₂K は、上記表 2 の右欄が G 又は U である 20 種のアミノ酸を示す。

[0108] mRNA 準備工程においては、「N₁N₂K」コドンには、あらゆるアミノ酸を割り当てることができ、タンパク質性アミノ酸だけでなく、例えば非タンパク質性アミノ酸を割り当ててもよい。例えば、非タンパク質性アミノ酸として、環状構造を含むアミノ酸、及び／又は N-アルキルアミノ酸を用いれば、タンパク質分解への耐性、細胞膜透過性、及び／又はコンフォメーションの剛性が増大した化合物ライブラリーを得ることができる傾向にある。かかる化合物ライブラリーは、細胞内の疾患関連分子を標的とするもの、及び／又はプロテアーゼ活性を有する分子を標的とする化合物のスクリーニングに有用である。

mRNA 準備工程において、複数の N₁N₂K の全てを非タンパク質性アミノ酸に割り当ててもよいし、その一部を非タンパク質性アミノ酸に割り当

ててもよい。

[0109] mRNAライブラリーは、各mRNAにおいて、開始コドン、複数のN1N2K、及び停止コドンがこの順に含まれるようにすることが好ましい。ここで、複数のN1N2Kの少なくとも1セットはHis又はTyrが割り当てられているコドンである。天然の遺伝暗号表を利用する場合、各mRNAは、例えばAUG-(N1N2K)_n-UAGの配列を含む。ここで、N1及びN2はそれぞれ独立に、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)及びウラシル(U)から選択され、Kはそれぞれ独立にウラシル(U)及びグアニン(G)のいずれかである。また、nは1以上49以下の整数である。nは上記範囲において、2以上、3以上、4以上、5以上、又は9以上であってよく、44以下、39以下、29以下、又は19以下であってよい。

[0110] ライブラリー調製工程において、天然の遺伝暗号表を利用して少なくとも1つのHis、Tyr、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチドをコードするmRNAライブラリー調製する場合、各mRNAは、開始コドン、複数のN1N2K、及び停止コドンがこの順に含まれ、複数のN1N2Kのうち少なくとも1セットは、CAU、CAC、UAU、及びUACのいずれか（すなわち、His又はTyrが割り当てられているコドンのいずれか）であることが好ましい。この場合、例えばCAUを含む例で説明すると、各mRNAは、AUG-(N1N2K)_{n1}-CAU-(N1N2K)_{n2}-UAGの配列を含む。ここで、N1、N2、及びKは上記と同義であり、n1及びn2はそれぞれ0以上48以下の整数である。n1とn2の和がn-1（nは上記と同義である。）となるように定められてよい。

[0111] 本実施形態の化合物の製造方法の基質の説明において、基質となるペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列中、His、Tyr、又はこれらの誘導体に隣接するN末端側の特に好ましいアミノ酸がThr、Ala、Gly、Ser、Val、Leu、Asn、Met、Pro、及びIleであることを説明した。この観点から、mRNAライブラリーにおける各mRNAは、例

例えば以下の表3に示される配列を含むことが好ましい（表3に示される配列中、RBUは例示であり、Thr、Ala、Gly、Ser、Val、Leu、Asn、Met、Pro、及びIleのいずれかをコードするコドンに置き換えてよい。）。表3中、N1、N2、及びKは上記と同義であり、Rはアデニン（A）及びグアニン（G）のいずれかであり、Bはグアニン（G）、シトシン（C）及びウラシル（U）のいずれかであり、m1及びm2はそれぞれ0以上47以下の整数である。m1及びm2は、m1とm2の和が0以上47以下となるような範囲で選択されてよい。m1とm2の和は、1以上、2以上、3以上、又は7以上であってよく、42以下、37以下、27以下、又は17以下であってよい。

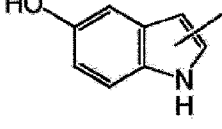
なお、表3において、CAUコドンは、その他のHis又はTyrをコードするコドン（例えば、CAC、UAU、及びUAC等）に置換してもよい。

[0112] [表3]

mRNA lib:	AUG (N1N2K) _{m1}	RBU	CAU (N1N2K) _{m2}	UAG
Peptide:	Met	A/I/G/T/V/S	His	Stop

[0113] ライブラリー調製工程が環状ペプチドを含む化合物のライブラリーを調製する工程である場合、例えば、下記の表4に示す官能基1を有するアミノ酸と、対応する官能基2を有するアミノ酸とを含むペプチドをコードするmRNAを含むmRNAライブラリーを用いてよい。

[0114] [表4]

	官能基1	官能基2
(A)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---C---X}_1 \\ \quad \quad \text{H}_2 \end{array} \quad (\text{A-1})$	HS— (A-2)
(B)	—C≡C—H (B-1)	N ₃ — (B-2)
(C)	—Ar—CH ₂ NH ₂ (C-1)	 (C-2)
(D)	—C≡C—CH ₂ —X ₁ (D-1)	HS— (D-2)
(E)	—Ar—CH ₂ —X ₁ (E-1)	HS— (E-2)

上記表4の化学構造式中、 X_1 は脱離基であり、 A_r は置換基を有していてもよい芳香環である。脱離基としては、例えば、 Cl 、 Br 及び I 等のハロゲン原子が挙げられる。

[0115] そのようなmRNAライブラリーを用いる場合、官能基1を有するアミノ酸と、対応する官能基2を有するアミノ酸が環状化した環状ペプチドを含む化合物のライブラリーを得ることができる。例えば(A-1)の官能基を有するアミノ酸と、(A-2)の官能基を有するアミノ酸とを含むペプチドをコードするmRNAライブラリーを用いてライブラリー調製工程を実施する場合、 $N-CO-CH_2-S$ 構造により形成される環状構造を含む環状ペプチドを調製することができる。

[0116] 官能基1及び2はどちらがN末端側にきてもよく、N末端とC末端に配置してもよいし、一方を末端アミノ酸、他方を非末端アミノ酸としてもよいし、両方を非末端アミノ酸としてもよい。官能基1と官能基2により形成される結合が、環状ペプチドにおける分子環状構造を形成するための化学架橋構造といえる。

[0117] (A-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、クロロアセチル化したアミノ酸を用いることができる。クロロアセチル化アミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-alanine、N-chloroacetyl-L-phenylalanine、N-chloroacetyl-L-tyrosine、N-chloroacetyl-L-tryptophan、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(2-chloroacetamido)benzoyl-L-tryptophan、 β -N-chloroacetyl-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-chloroacetyl-L-diaminobutyric acid、 δ -N-chloroacetyl-L-ornithine、 ϵ -N-chloroacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

(A-1)の官能基を有するアミノ酸としては、N-chloroacetyl-L-tyrosine、及びN-chloroacetyl-D-tyrosineが好適に用いられる。

[0118] (A-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptohepta

noic acid、及び2-amino-8-mercaptopoctanoic acid等が挙げられる。

(A-2)の官能基を有するアミノ酸としては、cysteineが好適に用いられる。

[0119] (A-1)の官能基を有するアミノ酸と(A-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Kawakami, T. et al., Nat. Chem. Biol. 5, 888-890 (2009); Yamagishi, Y. et al., ChemBioChem 10, 1469-1472 (2009); Sako, Y. et al., J. Am. Chem. Soc. 130, 7932-7934 (2008); Goto, Y. et al., ACS Chem. Biol. 3, 120-129 (2008); Kawakami T. et al, Chem. Biol. 15, 32-42 (2008)、及び国際公開第2008/117833号等に記載された方法が挙げられる。

[0120] (B-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、propargylglycine、homopropargylglycine、2-amino-6-heptynoic acid、2-amino-7-octynoic acid、及び2-amino-8-nonynoic acid等が挙げられる。

4-pentynoyl化や5-hexynoyl化したアミノ酸を用いてもよい。

4-pentynoyl化アミノ酸としては、例えば、N-(4-pentenoyl)-L-alanine、N-(4-pentenoyl)-L-phenylalanine、N-(4-pentenoyl)-L-tyrosine、N-(4-pentenoyl)-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、 β -N-(4-pentenoyl)-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-(4-pentenoyl)-L-diaminobutyric acid、 σ -N-(4-pentenoyl)-L-ornithine、 ϵ -N-(4-pentenoyl)-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

5-hexynoyl化アミノ酸としては、4-pentynoyl化アミノ酸として例示した化合物において、4-pentynoyl基が、5-hexynoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0121] (B-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、azidoalanine、2-amino-4-azidobutanoic acid、azidoptonorvaline、azidonorleucine、2-amino-7-azidoheptanoic acid、及び2-amino-8-azidooctanoic acid等が挙げら

れる。

azidoacetyl化や3-azidopentanoyl化したアミノ酸を用いることもできる。

azidoacetyl化アミノ酸としては、例えば、N-azidoacetyl-L-alanine、N-azidoacetyl-L-phenylalanine、N-azidoacetyl-L-tyrosine、N-azidoacetyl-L-tryptophan、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-phenylalanine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tyrosine、N-3-(4-pentynoylamido)benzoyl-L-tryptophan、 β -N-azidoacetyl-L-diaminopropanoic acid、 γ -N-azidoacetyl-L-diaminobutyric acid、 σ -N-azidoacetyl-L-ornithine、 ϵ -N-azidoacetyl-L-lysine、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

3-azidopentanoyl化アミノ酸としては、azidoacetyl化アミノ酸として例示した化合物において、azidoacetyl基が、3-azidopentanoyl基に置換されたアミノ酸が挙げられる。

[0122] (B-1)の官能基を有するアミノ酸と(B-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Sako, Y. et al., J. Am. Chem. Soc. 130, 7932-7934 (2008)、及び国際公開第2008/117833号等に記載された方法が挙げられる。

[0123] (C-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、N-(4-aminomethyl-benzoyl)-phenylalanine (AMBF)及び3-aminomethyltyrosine等が挙げられる。

(C-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、5-hydroxytryptophan(WOH)等が挙げられる。

(C-1)の官能基を有するアミノ酸と(C-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、Yamagishi, Y. et al., Chembiochem 10, 1469-1472 (2009)、及び国際公開第2008/117833号に記載された方法等が挙げられる。

[0124] (D-1)の官能基を有するアミノ酸としては、例えば、2-amino-6-chloro-hexynoic acid、2-amino-7-chloro-heptynoic acid、及び2-amino-8-chloro-octynoic acid等が挙げられる。

(D-2)の官能基を有するアミノ酸としては、例えばcysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

(D-1)の官能基を有するアミノ酸と(D-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、国際公開第2012/074129号に記載された方法等が挙げられる。

[0125] (E-1)のアミノ酸としては、例えば、N-3-chloromethylbenzoyl-L-phenylalanine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tyrosine、N-3-chloromethylbenzoyl-L-tryptophan、及びこれらに対応するD-アミノ酸誘導体等が挙げられる。

(E-2)のアミノ酸としては、例えば、cysteine、homocysteine、mercaptonorvaline、mercaptonorleucine、2-amino-7-mercaptoheptanoic acid、及び2-amino-8-mercaptooctanoic acid等が挙げられる。

(E-1)の官能基を有するアミノ酸と(E-2)の官能基を有するアミノ酸による環状化方法は、例えば、(A-1)と(A-2)の環状化方法や(D-1)と(D-2)の環状化方法を参考にして行うことができる。

[0126] ライブラリー調製工程が環状ペプチドを含む化合物のライブラリーを調製する工程である場合、mRNAライブラリーにおける各mRNAは、例えば以下の表5に示される配列を含むことが好ましい。下記表5中、N1、N2、K、R、及びBは上記表3と同義であり、m3及びm4はそれぞれ0以上46以下の整数であり、(linker)は任意の配列である。m3及びm4は、m3とm4の和が0以上46以下となるような範囲で選択されてよい。m1とm2の和は、1以上、2以上、3以上、又は6以上であってよく、41以下、36以下、26以下、又は16以下であってよい。

[0127] [表5]

mRNA lib:	AUG	(N1N2K) _{m3}	RBU	CAU	(N1N2K) _{m4}	UGU (linker)	UAG
Peptide:	ClAc-D/LY/W/F		A/I/G/T/V/S	His		Cys	Stop

[0128] なお、上記表では、AUGコドンにN-クロロアセチルアミノ酸が割り当

てられており、当該アミノ酸のクロロアセチル基と、下流に存在するCysのメルカプト基とにより環状ペプチドを形成する。上記表中、AUGコドンにはD-又はL-Tyr、Trp、又はPheが割り当てられているが、割り当てられるアミノ酸はTyr、Trp、及びPheに限られない。

AUGコドンにN-クロロアセチルアミノ酸を割り当てるためには、例えば、上述のフレキシザイムを用いてよい。

[0129] ライブラリー調製工程では、mRNA準備工程により準備したmRNAライブラリーを、その後翻訳する（以下、「翻訳工程」という。）。翻訳工程は、例えば、N1N2N3コドンのいずれかに対応するアンチコドンを含み、当該コドンに割り当てられたアミノ酸がチャージされたtRNAを含む無細胞翻訳系で行われてよい。無細胞翻訳系に含まれるN1N2N3コドン及びtRNAは例えば20種類であってよい。

[0130] 無細胞翻訳系としては、既存の翻訳系の構成因子を目的に合わせて自由に取り除き、あるいはその他の構成因子を自由に追加し、必要な成分だけを再構築して得られる翻訳系を用いてよい。例えば、特定のアミノ酸を除去した翻訳系を再構築すると、当該アミノ酸に対応するコドンがいずれのアミノ酸もコードしない空きコドンになる。そこで、フレキシザイム等を利用して、その空きコドンに相補的なアンチコドンを含するtRNAに任意のアミノ酸をチャージし、これを加えて翻訳を行うと、当該任意のアミノ酸がそのコドンでコードされることになる。これにより、除去したアミノ酸の代わりに当該任意のアミノ酸が導入されたペプチドを調製することができる。

[0131] 無細胞翻訳系におけるtRNAは、生物（例えば大腸菌）由来野生型tRNAであってよく、*in vitro*の転写で調製した人工tRNAであってもよい。

無細胞翻訳系で用いられる20種類のN1N2N3コドンに対応する20種類のtRNAは、アンチコドンループ部分以外、同じ配列を有していてもよい。このような態様によれば、特定のtRNAの反応性が高く又は低くなることがなく、各tRNAが均一な反応性を有するようになり、再現性よく

所望のペプチドを発現させることが可能となる。

- [0132] なお、本明細書において「無細胞翻訳系」とは、細胞を含まない翻訳系をいい、無細胞翻訳系としては、例えば、大腸菌抽出液、小麦胚芽抽出液、ウサギ赤血球抽出液、昆虫細胞抽出液等を用いることができる。また、それぞれ精製したリボソームタンパク質、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS)、リボソーム RNA、アミノ酸、rRNA、GTP、ATP、翻訳開始因子 (IF) 伸長因子 (EF)、終結因子 (RF)、及びリボソーム再生因子 (RRF)、並びに翻訳に必要なその他の因子を再構築することで構築した、再構築型の無細胞翻訳系を用いてもよい。

DNA からの転写を併せて行う観点から、RNA ポリメラーゼを含む無細胞翻訳系を用いてもよい。

- [0133] 市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系であるロシュ・ダイアグノスティックス社の RTS-100 (登録商標) ; 再構築型翻訳系である PGI 社の PURE SYSTEM (登録商標)、ジーンフロンティア社の PUREflex、及び New England BioLabs 社の PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit 等 ; 小麦胚芽抽出液を用いた系であるゾイジーン社又はセルフリースサイエンス社のもの等が挙げられる。

また、大腸菌のリボソームを用いる系としては、例えば次の文献に記載された技術が公知である : H. F. Kung et al., 1977, The J. Biol. Chem. Vol. 252, No. 19, 6889-6894; M. C. Gonza et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 82, 1648-1652; M. Y. Pavlov and M. Ehrenberg, 1996, Arch. Biochem. Biophys. Vol. 328, No. 1, 9-16; Y. Shimizu et al., 2001, Nat. Biotechnol. Vol. 19, No. 8, 751-755; H. Ohashi et al., 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 352, No. 1, 270-276。

- [0134] 無細胞翻訳系は、伸長用 tRNA を含み、開始 tRNA をさらに含んでもよい。本発明者らは、これまでに、フレキシザイムを利用したコドンの再割当等により、N1N2N3 が任意のアミノ酸をコードする翻訳系を構築して

いる。

天然の翻訳系においては、各アミノ酸に対応したアンチコドンをもつ tRNA が存在し、各 tRNA は、アンチコドンループ以外の領域においてもそれぞれ固有の配列を有するが、フレキシザイムを利用し、N1N2N3 のすべてに任意のアミノ酸を再割当する場合、tRNA をすべて人工のものとして行うことができる。この場合、翻訳系に含まれる各 N1N2N3 に対応する伸長 tRNA は、全長の 80% 以上、85% 以上、88% 以上、又は 90% 以上が同一の塩基配列からなるものであってもよい。すなわち、アンチコドンを除いた配列のうち、ほとんど配列が同じである伸長 tRNA 群を用いることができる。伸長 tRNA 群は、アンチコドンループ以外すべて同じ塩基配列のものとしてもよい。翻訳系に加える各 N1N2N3 に対応する伸長 tRNA は、アンチコドンループ以外の部分の配列が、85% 以上、88% 以上、90% 以上、93% 以上、95% 以上、98% 以上、又は 99% 以上同一のものであってもよい。

[0135] 本明細書において、「アンチコドンループ」とは、tRNA におけるアンチコドンを含む一本鎖のループ部分を示す。アンチコドンループの配列は、コドン-アンチコドンの相互作用を相補するように、当業者が適宜決定することが可能である。

[0136] 以上に説明したような無細胞翻訳系を用いた方法によれば、発現産物を精製することなく純度の高い形で得ることができる傾向にある。さらに、mRNA における N1N2N3 の多様性に基づき、 $1 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ 種類以上の異なるペプチドを含むライブラリーを製造することが可能である。

[0137] ライブラリー調製工程は、ディスプレイ法、特に mRNA ディスプレイ法により、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーを調製する工程であってもよい。

[0138] ディスプレイ法とは、表現型 (phenotype) とその配列をコードした遺伝子型 (genotype) とを共有結合又は非共有結合で連結することにより、表現型を遺伝子型にディスプレイし、試験管に再構築された複

製システムを用いて活性種を濃縮、及び増幅（すなわち、セクション）することを可能にするシステムを指す。

ディスプレイ法としては、例えば、大腸菌を複製媒体とするファージディスプレイ、及びイーストディスプレイ等が挙げられる。また、ディスプレイ法には、原核又は真核生命体を媒体としない *in vitro* ディスプレイも含まれ、特に *in vitro* ディスプレイによれば、ファージディスプレイよりもより多様なライブラリーの探索が可能となる。

in vitro ディスプレイとしては、*ribosome* ディスプレイ、*cDNA* ディスプレイ、及び *mRNA* ディスプレイ等が挙げられる。

[0139] *mRNA* ディスプレイ法により、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーを調製する工程は、各 *mRNA* が少なくとも1つの *His*、*Tyr*、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質をコードする *mRNA* ライブラリーを準備する工程と、*mRNA* ライブラリーの各 *mRNA* の3'末端にピューロマイシンを結合させ、ピューロマイシン結合 *mRNA* ライブラリーを製造する工程と、ピューロマイシン結合 *mRNA* ライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳する工程と、を含むことが好ましい。

[0140] *mRNA* ライブラリーを準備する工程及びピューロマイシン結合 *mRNA* ライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳する工程は、それぞれ上述の *mRNA* 準備工程及び翻訳工程と同様に実施することができる。

ピューロマイシン結合 *mRNA* ライブラリーを製造する工程は、上述したペプチドライブラリーの製造方法において *mRNA* ライブラリーを調製する際、各 *mRNA* の *ORF* (*Open reading frame*) の下流領域にピューロマイシンを結合させることによって行えばよい。ピューロマイシンは、ペプチドや核酸で構成されるリンカーを介して *mRNA* に結合させてもよい。*mRNA* の *ORF* 下流領域にピューロマイシンを結合させることにより、*mRNA* の *ORF* を翻訳したリボソームがピューロマイシンを取り込み、*mRNA* とペプチドの複合体が形成される。このようなペプチド-

mRNA複合体は、遺伝子型と表現型とを対応付けることができ、*in vitro*ディスプレイに応用できる。

[0141] (化合物ライブラリー)

本実施形態の一態様は、上述した製造方法により製造される化合物ライブラリーである。本実施形態の化合物ライブラリーは、上述したペプチド又はタンパク質を含む化合物のライブラリー、及びペプチド又はタンパク質を含む化合物とmRNAとの複合体のライブラリーを含む。

[0142] [スクリーニング方法]

本実施形態の一態様は、上述の製造方法のいずれかにより製造された化合物ライブラリー、好ましくはペプチド又はタンパク質を含む化合物とmRNAとの複合体のライブラリーを標的物質に接触させる工程と、標的物質に結合する化合物を選択する工程とを含む、標的物質に結合する化合物を同定するスクリーニング方法である。

[0143] 化合物と標的物質とを接触させる工程は、例えば化合物と標的物質とが共存する系をインキュベートする方法、及び標的物質を固相担体に固定して、化合物を含む液相を当該固相担体と接触させる方法等であってよい。当該接触は、適宜選択された緩衝液中で実施してよく、pH、温度、及び接触時間等を調節して相互作用させてよい。

本明細書において、「固相担体」は、標的物質を固定できる担体であれば特に限定されず、ガラス製、金属製及び樹脂製等のマイクロタイタープレート、基板、ビーズ、ニトロセルロースメンブレン、ナイロンメンブレン、並びにPVDFメンブレン等が挙げられる。標的物質は、これらの固相担体に公知の方法に従って固定することができる。

[0144] 本明細書において、「標的物質」は特に限定されず、低分子化合物、高分子化合物、核酸、ペプチド、タンパク質、糖、及び脂質等であってよい。特に、上記の化合物ライブラリーは、標的物質がプロテアーゼ活性を有する場合や細胞内の分子である場合にも用いることができる。

[0145] 標的物質に結合する化合物を選択する工程は、例えば、化合物を公知の方

法に従って検出可能に標識し、上記の化合物と標的物質とを接触させる工程の後、緩衝液で固相担体表面を洗浄し、標的物質に結合している化合物を検出して行うことができる。

検出可能な標識としては、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ等の酵素； ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{18}F 及び ^3H 等の放射性物質；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ダンシルクロリド、フィコエリトリン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、及び近赤外蛍光材料等の蛍光物質；ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン等の発光物質；並びに、金コロイド及び量子ドット等のナノ粒子が挙げられる。標識として酵素を用いる場合、酵素の基質を酵素と接触させることにより発色させ、検出することもできる。また、化合物にビオチンを結合させ、酵素等で標識したアビジン又はストレプトアビジンを結合させて検出することもできる。

[0146] また、単に結合の有無又は程度を検出及び測定するのみでなく、標的物質の活性の亢進又は阻害を測定し、かかる亢進活性又は阻害活性を有する化合物を同定することも可能である。このような方法により、生理活性を有し、医薬として有用な化合物の同定も可能となる。

[0147] 本実施形態のスクリーニング方法では、標的物質に結合する化合物を選択する工程にディスプレイ法を適用してもよい。本実施形態のスクリーニング方法において、mRNAを含む化合物のライブラリーを用いる場合、標的物質に結合する化合物を選択する工程にmRNAディスプレイ法を適用できる。

[0148] mRNAディスプレイ法では、mRNAを含む化合物のライブラリーに対して逆転写反応を行うことにより、cDNAライブラリーが得られる。このcDNAライブラリーにおける各cDNAは、標的分子に結合するペプチド又はタンパク質をコードする。

cDNAライブラリーを増幅し、これを転写することによって再度mRNAライブラリーを得ることができる。再度得られたmRNAライブラリーは、当初のmRNAライブラリーに比較して、標的分子に結合する分子の濃度

が高くなっている。したがって、上述の工程を複数回繰り返すことにより、標的分子に結合する分子を徐々に濃縮することができる。

濃縮されたペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列は、cDNAの配列を解析することによって特定できるため、当該配列情報に基づいて、標的分子に対して高い親和性を有する化合物を選択することが容易である。

[0149] R a P I Dシステム (Yamagishi, Y. et al., Chem. Biol., 2011, 18(12), 1562-70) は、後述する実施例で用いたF I TシステムとmRNAディスプレイ法とを組み合わせたスクリーニング系の一例である。

[0150] (スクリーニング用キット)

本実施形態の別の一態様は、化合物のスクリーニング用キットである。本実施形態のスクリーニング用キットの一態様は、上述の製造方法で製造された化合物ライブラリーを含む。

スクリーニング用キットは、上記化合物ライブラリーに加え、標的物質と化合物との結合を検出するのに必要な試薬及び装置を含んでいてよい。かかる試薬及び装置としては、例えば、固相担体、緩衝液、標識用試薬、酵素、酵素反応停止液、及びマイクロプレートリーダーが挙げられるが、これらに限定されない。

[0151] 本明細書で述べた上記の実施形態のいずれにおいても、本明細書において記載する態様、及び本明細書において好ましい態様等として記載する態様を任意に組み合わせた態様とすることができる。

実施例

[0152] 以下、本発明を実施例及び比較例を用いてより具体的に説明する。本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

[0153] [材料]

特に断りのない限り、実施例で用いた試薬等は、ナカライテスク、和光純薬工業、シグマアルドリッチジャパン、関東化学、又は渡辺化学工業から購入し、精製することなく使用した。ゲラニルピロリン酸はIsopronoid, LCから購入した。ファルネシルピロリン酸はシグマアルドリッチジャパンから購

入した。オリゴプライマーは全てEurofins Genomics (O P C精製グレード)から購入した。

[0154] [一般的な実験手順]

合成基質及び酵素反応生成物を分析するための液体クロマトグラフィーー質量分析 (L C - M S) 実験は、A c q u i t y 1 - C l a s s U P L C システムを備えたW a t e r s X e v o G 2 - X S Q T o F 装置を用いて行った。注入された試料は、A c q u i t y U P L C P e t i d e B E H C 1 8 カラム (3 0 0 Å、1. 7 μ m、2. 1 m m × 1 5 0 m m) で分離し、その際以下の勾配を用いた：1 % B × 2 分間；1 ~ 6 1 % B × 6 分間；9 5 % B × 1 分間；1 % B × 3 分間 (合計ランタイム：1 2 分間)、又は1 % B × 2 分間；1 ~ 8 1 % B × 1 6 分間；9 5 % B × 1 分間；1 % B × 3 分間 (合計ランタイム：2 2 分間) (移動相 A : 0. 1 % (v / v) ギ酸水溶液；及び B : 0. 1 % (v / v) ギ酸アセトニトリル溶液)。その後X e v o Q T o f M S に直接導入した。

[0155] すべてのM S 分析を、キャピラリー電圧0. 7 k V のポジティブモードで実施し、窒素をコーンガス (5 0 L / 分) 及び脱溶媒ガス (1 0 0 0 L / 分) として使用した。イオン化源の温度は1 2 0 ° C、脱溶媒ガスは4 0 0 ° C とした。M S / M S 分析において、スペクトルを0. 3 秒のスキャン時間で取得し、選択したイオンを1 5 ~ 3 0 又は2 5 ~ 4 0 e V の衝突エネルギーのランプにかけた。L C - M S データをM a s s L y n x 4. 1 を用いて分析し、M S / M S スペクトルの帰属は手動で行った。選択したイオンを有する抽出イオンクロマトグラム (E I C) の生成にあたっては、m / z の許容誤差を0. 1 0 に設定した。合成基質及び酵素反応生成物の精製では、C h r o m o l i t h P r e p カラム (1 0 0 × 2 5 m m、C 1 8 相、M e r c k) を備えたL C - 2 0 A P 装置 (島津) を、移動相 A : 0. 1 % (v / v) トリフルオロ酢酸 (T F A) 水溶液、及び B : 0. 1 % (v / v) T F A アセトニトリル溶液と共に使用した。

[0156] [プレニル基転移酵素の発現及び精製方法]

コドン最適化したLimF合成遺伝子をEurofins Genomicsから購入し、In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa Clontech) を用いて、SUMOstar-LimFをコードしたcDNAをpET32 vector (Novagen) へと導入することで、pET32-LimF-SMSプラスミドを作製した。

大腸菌におけるLimF-SUMO融合タンパク質の発現のために、100 mg/Lのアンピシリンナトリウムを選択マーカーとして用いて、pET32-LimF-SMSプラスミドをE. coli BL21 Gold (DE3) に形質転換した。得られた形質転換体を、100 mg/Lアンピシリンナトリウムを含む2xYT培地中で培養した。OD600が0.8に達するまで160 rpmで振盪しながら、培養物を37℃でインキュベートした。次いで、培養物を氷上で冷却し、すぐにイソプロピル-β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) 及びエタノールをそれぞれ0.2 mM及び3% (v/v) の最終濃度で添加した。IPTG誘導後、培養物を20℃、180 rpmで20時間インキュベートし、次いで、細胞ペレットを4℃で遠心分離 (6000×g、15分間) により回収した。ペレットを100 mLの溶解緩衝液 (40 mMのK₂HPO₄、10 mMのKH₂PO₄、500 mMのNaCl、20 mMのイミダゾール、1 mMのDTT、0.1 mMのPMSF、0.5%のtriton X-100、pH 7.5) 中に再懸濁し、氷上で超音波処理によって破壊した。4℃で遠心分離 (20000×g、30分間) した後にろ過し、可溶性画分を回収した。

[0157] 緩衝液A (40 mM K₂HPO₄、10 mM KH₂PO₄、500 mM NaCl、20 mMイミダゾール、1 mM DTT、pH 7.5) で予め平衡化させたHis tag HP 5 mLカラム (Cytiva) に、回収した可溶性画分を注入した。His tag LimF-SUMO融合タンパク質を、200 mMのイミダゾールを含む緩衝液Aで溶出した。次いで、タンパク質を緩衝液B (20 mM Tris-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM DTT) に対して、4℃で6時間透析した。その後、

SUMOstar プロテアーゼを透析膜中に添加し、さらに4℃で6時間透析することでSUMOタグを除去した。次に、タグフリーのLimFを、緩衝液C (10mM Hepes pH 7.5、150mM NaCl、1mM DTT) で予め平衡化したHitrap SP 5mLカラム (Cytiva) に注入し、250mM NaClを含む緩衝液Cで溶出した。次いで、精製された画分をHiLoad 16/60 Superdex 200プレパックドゲル濾過カラム (Cytiva) に4℃で注入し、緩衝液Cで溶出させた。次いで、タグフリーLimF画分を、アミコン遠心フィルター (Merck) によって濃縮した。タンパク質の純度をSDS-PAGE分析によって確認し、タンパク質濃度をExPASy ProtParamツールによって計算した280nmの吸光度を用いて測定した。次に、タンパク質を液体窒素で急速凍結し、-80℃で保存した。

[0158] [ペプチドの化学合成方法]

Syro I自動合成装置 (Biotage) 上で、標準的なFmoc SPPSプロトコルを用いて、後述の実施例で用いられる環状ペプチドbcLimE1、E2及びE3を合成した。2-クロロトリチルクロリド樹脂にFmoc-Tyr(tBu)-OH (0.877mmol/gローディング) をプレチャージし、0.025mmolの樹脂を用いてペプチドをC末端酸として合成した。側鎖保護基は、以下の組み合わせとした: Asp(OtBu)、Glu(OtBu)、His(Boc)、Lys(Boc)、Asn(Trt)、Gln(Trt)、Arg(Pbf)、Ser(tBu)、Thr(tBu)、Tyr(tBu)。

2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) を活性剤として、ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) を塩基として用いて、ペプチドカップリング反応を行った。Fmoc-脱保護は20% (v/v) ピペリジンDMF溶液を用いて行った。他に記載のない限り、全ての試薬をジメチルホルムアミド (DMF) 中に溶解し、DMF中で反応を実施した。

[0159] S P P S後、樹脂をジクロロメタン (DCM) で4回洗浄し、真空中で乾燥した。5 mLの2.5%トリイソプロピルシラン (TIS) を添加した20%の1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) DCM溶液中で、樹脂を室温で3時間反応させることで、完全に保護された直鎖前駆体ペプチドを樹脂から切断した。切断されたペプチドを含有する溶液に40 mLの氷冷ジエチルエーテルを加え、その後-20℃で30分放置することでペプチドを沈殿させた。ペプチドペレットを手動遠心分離により回収した後、10 mLの氷冷ジエチルエーテルで4回洗浄した。洗浄したペレットをドラフト中で一晩乾燥し、残留ジエチルエーテルを除去した。

各直鎖前駆体ペプチドペレットを10 mLのDMFで溶解した。1.1当量のベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) 及び2.2当量のDIPEAを添加し、室温で6時間環化反応を行った。環化後、10 mLのDCMを加え、100 mLの水で2回抽出した。ペプチドを含む有機相を集め、ロータリーエバポレータで溶媒を除去した。

[0160] 次に、5 mLのTFA/水/TIS (95:2.5:2.5、v/v) 溶液を用いて、室温で3時間反応させることで、側鎖保護基の脱保護を行った。脱保護されたペプチドを前述のようにジエチルエーテルを用いて沈殿させた後、さらにジエチルエーテルで洗浄した。乾燥したペレットを、0.1% TFAを含む5 mLのジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、濾過し、分取逆相HPLCによって精製した。所望の生成物を含有する画分を回収し、凍結乾燥し、DMSOに再溶解して、ペプチド溶液を得た。

[0161] 短いペプチドの合成については、上記と同様のSPPS法をNovaPEG Rink Amide樹脂 (0.44 mmol/gローディング) を用いて実施することで、C末端がアミド化されたペプチドを合成した。ペプチド鎖の伸長後、0.5 M Ac₂O及び0.25 M DIPEAを含むNMP 2 mL中で、樹脂を室温で60分間反応させることで、N末端をアセチル化

した。樹脂をDMFで3回、DCMで4回それぞれ洗浄した後、TFA／水／TIS溶液中で、室温で3時間反応させることでペプチドを樹脂から切断した。上述と同様の後処理及び精製手順により精製ペプチドを得た。チオエーテル環状ペプチドの合成には、既報の方法を用いた (Passioura, T.; Liu, W.; Dunkelmann, D.; Higuchi, T.; Suga, H. Display selection of exotic macrocyclic peptides expressed under a radically reprogrammed 23 amino acid genetic code. J. Am. Chem. Soc., 2018, 140 (37), 11551-11555.)。

[0162] [フレキシザイム及びtRNAの調製方法]

dFx、eFx、tRNA^{GluE2}_{GUG}、及びtRNA^{fMet}_{CAU}は、既報のようにT7 RNAポリメラーゼを用いた*in vitro*転写によって調製した (Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, Nat. Protoc., Flexizymes for genetic code reprogramming. 2011, 6 (6), 779-790.)。

[0163] [フレキシザイムによるアミノアシル化tRNAの調製方法]

CIAc-D-Phe及びCIAc-D-TyrはeFxを用いてtRNA^{fMet}_{CAU}に、3-Me-L-His、1-Me-L-His、L-Ala (2-Thi)、L-Ala (3-Thi)、及び α -Me-D/L-HisはeFxを用いてtRNA^{GluE2}_{GUG}に、L-His、D-His及びL-Ala (4-Thz)はdFxを用いてtRNA^{GluE2}_{GUG}に、それぞれチャージした。アミノアシル化反応は、25 μ Mのフレキシザイム (eFx又はdFx)、25 μ MのtRNA、5 mMの活性化アミノ酸ドナー (eFx反応：シアノメチルエステル、dFx反応：3, 5-ジニトロベンジルエステル)、100 mMのHEPES-KOH pH 7.5、600 mMのMgCl₂、及び20%のDMSOを含む溶液で行った。活性化アミノ酸は、既報のように調製した (Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, Nat. Protoc., Flexizymes for genetic code reprogramming. 2011, 6 (6), 779-790.; Passioura, T.; Liu, W.; Dunkelmann, D.; Higuchi, T.; Suga, H. J. Am. Chem. Soc., Display selection of exotic macrocyclic peptides expressed under a r

adically reprogrammed 23 amino acid genetic code. 2018, 140 (37), 11551-11555.)。

各アミノアシル化反応混合物を氷上で2時間 (C l A c - D - P h e 及び C l A c - D - T y r) あるいは6時間 (その他のアミノ酸) インキュベートし、次いで、4倍量の0.3 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) 及び10倍量のE t O Hを加えた。次いで、室温で15分間遠心分離 (15300×g) し、上清を廃棄した。アミノアシル t R N Aペレットを、0.1 M酢酸ナトリウム (pH 5.2) を含有する70% E t O Hで2回、及び70% E t O Hで1回洗浄した。得られたアミノアシル t R N Aを10分間乾燥した。アミノアシル t R N Aは、翻訳混合物に添加する直前に1 mM酢酸ナトリウム (pH 5.2) に溶解し、250 μMの溶液とした。

[0164] [基質のためのDNA鋳型の調製方法]

以下の実施例で用いた鋳型DNAは、以下の表6 (表6-1及び6-2として示す。) 及び7 (表7-1～7-4として示す。) に示すプライマーを用いて調製した。既報 (Vinogradov, A. A.; Shimomura, M.; Goto, Y.; Ozaki, T.; Asamizu, S.; Sugai, Y.; Suga, H.; Onaka, Nat. Commun., Minimal lactazole scaffold for in vitro thiopeptide bioengineering. 2020, 11 (1), 1-13.) と同様にして、チオエーテル閉環環状ペプチド (以下、「t e M P」という。) をコードした配列の上流にT7プロモーターを有する直鎖二本鎖DNAを、Taq DNAポリメラーゼを用いて調製した。

[0165]

[表6-1]

名前	Extension		PCR	
	Forward primer	Reverse primer	Forward primer	Reverse primer
teLimE2	T7exF43	teLimE2-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1A)	T7exF43	teLimE2(P-1A)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1D)	T7exF43	teLimE2(P-1D)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1E)	T7exF43	teLimE2(P-1E)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1F)	T7exF43	teLimE2(P-1F)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1G)	T7exF43	teLimE2(P-1G)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1H)	T7exF43	teLimE2(P-1H)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1I)	T7exF43	teLimE2(P-1I)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1K)	T7exF43	teLimE2(P-1K)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1L)	T7exF43	teLimE2(P-1L)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1M)	T7exF43	teLimE2(P-1M)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1N)	T7exF43	teLimE2(P-1N)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1Q)	T7exF43	teLimE2(P-1Q)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1R)	T7exF43	teLimE2(P-1R)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1S)	T7exF43	teLimE2(P-1S)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1T)	T7exF43	teLimE2(P-1T)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1V)	T7exF43	teLimE2(P-1V)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1W)	T7exF43	teLimE2(P-1W)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(P-1Y)	T7exF43	teLimE2(P-1Y)-R1	T7pcrF22	teLimE2-R2
teLimE2(E+1A)	T7exF43	teLimE2(E+1A)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1A)-R2
teLimE2(E+1D)	T7exF43	teLimE2(E+1D)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1D)-R2
teLimE2(E+1F)	T7exF43	teLimE2(E+1F)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1F)-R2
teLimE2(E+1G)	T7exF43	teLimE2(E+1G)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1G)-R2
teLimE2(E+1H)	T7exF43	teLimE2(E+1H)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1H)-R2
teLimE2(E+1I)	T7exF43	teLimE2(E+1I)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1I)-R2
teLimE2(E+1K)	T7exF43	teLimE2(E+1K)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1K)-R2
teLimE2(E+1L)	T7exF43	teLimE2(E+1L)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1L)-R2
teLimE2(E+1M)	T7exF43	teLimE2(E+1M)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1M)-R2
teLimE2(E+1N)	T7exF43	teLimE2(E+1N)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1N)-R2
teLimE2(E+1P)	T7exF43	teLimE2(E+1P)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1P)-R2
teLimE2(E+1Q)	T7exF43	teLimE2(E+1Q)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1Q)-R2
teLimE2(E+1R)	T7exF43	teLimE2(E+1R)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1R)-R2
teLimE2(E+1S)	T7exF43	teLimE2(E+1S)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1S)-R2
teLimE2(E+1T)	T7exF43	teLimE2(E+1T)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1T)-R2
teLimE2(E+1V)	T7exF43	teLimE2(E+1V)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1V)-R2
teLimE2(E+1W)	T7exF43	teLimE2(E+1W)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1W)-R2
teLimE2(E+1Y)	T7exF43	teLimE2(E+1Y)-R1	T7pcrF22	teLimE2(E+1Y)-R2
teMP(3aa)	T7exF43	teMP(3aa)-R1	T7pcrF22	teMP(3aa)-R2
teMP(4aa)	T7exF43	teMP(4aa)-R1	T7pcrF22	teMP(4aa)-R2
teMP(5aa)	T7exF43	teMP(5aa)-R1	T7pcrF22	teMP(5aa)-R2
teMP(6aa)	T7exF43	teMP(6aa)-R1	T7pcrF22	teMP(6aa)-R2

[0166]

[表6-2]

名前	Extension		PCR	
	Forward primer	Reverse primer	Forward primer	Reverse primer
teMP(7aa)	T7exF43	teMP(7aa)-R1	T7pcrF22	teMP(7aa)-R2
teMP(8aa)	T7exF43	teMP(8aa)-R1	T7pcrF22	teMP(8aa)-R2
teMP(9aa)	T7exF43	teMP(9aa)-R1	T7pcrF22	teMP(9aa)-R2
teMP(10aa)	T7exF43	teMP(10aa)-R1	T7pcrF22	teMP(10aa)-R2
teMP(11aa)	T7exF43	teMP(11aa)-R1	T7pcrF22	teMP(11aa)-R2
teMP(12aa)	T7exF43	teMP(12aa)-R1	T7pcrF22	teMP(12aa)-R2
teMP(13aa)	T7exF43	teMP(13aa)-R1	T7pcrF22	teMP(13aa)-R2
teMP(14aa)	T7exF43	teMP(14aa)-R1	T7pcrF22	teMP(14aa)-R2
teMP(16aa)	T7exF43	teMP(16aa)-R1	T7pcrF22	teMP(16aa)-R2
teMP(18aa)	T7exF43	teMP(18aa)-R1	T7pcrF22	teMP(18aa)-R2
teR1	T7exF43	teR1-R1	T7pcrF22	teR1-R2
teR2	T7exF43	teR2-R1	T7pcrF22	teR2-R2
teR3	T7exF43	teR3-R1	T7pcrF22	teR3-R2
teR4	T7exF43	teR4-R1	T7pcrF22	teR4-R2
teR5	T7exF43	teR5-R1	T7pcrF22	teR5-R2
teR1(P-1K)	T7exF43	teR1(P-1K)-R1	T7pcrF22	teR1(P-1K)-R2
teR2(W+1P)	T7exF43	teR2(W+1P)-R1	T7pcrF22	teR2(W+1P)-R2
teR3(E-1S)	T7exF43	teR3-R1	T7pcrF22	teR3(E-1S)-R2
teR4(W-1A)	T7exF43	teR4-R1	T7pcrF22	teR4(W-1A)-R2
teR5(P+1A)	T7exF43	teR5(P+1A)-R1	T7pcrF22	teR5(P+1A)-R2
teLimE2-CAC	T7exF43	teLimE2-CAC-R1	T7pcrF22	teLimE2-CAC-R2
teR6	T7exF43	teR6-R1	T7pcrF22	teR6-R2
teR6-H5A	T7exF43	teR6-H5A-R1	T7pcrF22	teR6-H5A-R2
teR6-H5A(T-1A)	T7exF43	teR6-H5A(T-1A)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1A)-R2
teR6-H5A(T-1D)	T7exF43	teR6-H5A(T-1D)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1D)-R2
teR6-H5A(T-1E)	T7exF43	teR6-H5A(T-1E)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1E)-R2
teR6-H5A(T-1F)	T7exF43	teR6-H5A(T-1F)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1F)-R2
teR6-H5A(T-1G)	T7exF43	teR6-H5A(T-1G)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1G)-R2
teR6-H5A(T-1H)	T7exF43	teR6-H5A(T-1H)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1H)-R2
teR6-H5A(T-1I)	T7exF43	teR6-H5A(T-1I)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1I)-R2
teR6-H5A(T-1K)	T7exF43	teR6-H5A(T-1K)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1K)-R2
teR6-H5A(T-1L)	T7exF43	teR6-H5A(T-1L)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1L)-R2
teR6-H5A(T-1M)	T7exF43	teR6-H5A(T-1M)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1M)-R2
teR6-H5A(T-1N)	T7exF43	teR6-H5A(T-1N)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1N)-R2
teR6-H5A(T-1P)	T7exF43	teR6-H5A(T-1P)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1P)-R2
teR6-H5A(T-1Q)	T7exF43	teR6-H5A(T-1Q)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1Q)-R2
teR6-H5A(T-1R)	T7exF43	teR6-H5A(T-1R)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1R)-R2
teR6-H5A(T-1S)	T7exF43	teR6-H5A(T-1S)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1S)-R2
teR6-H5A(T-1V)	T7exF43	teR6-H5A(T-1V)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1V)-R2
teR6-H5A(T-1W)	T7exF43	teR6-H5A(T-1W)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1W)-R2
teR6-H5A(T-1Y)	T7exF43	teR6-H5A(T-1Y)-R1	T7pcrF22	teR6-H5A(T-1Y)-R2

[0167]

[表7-1]

名前	塩基配列 (5' to 3')	配列番号
T7pcrF22	GGCGTAATACGACTCACTATAG	14
T7exF43	TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAAGGAGAAAAAC	15
teLimE2(P-1A)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGTGCATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	16
teLimE2(P-1D)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGTGCATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	17
teLimE2(P-1E)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGTTCATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	18
teLimE2(P-1F)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGAAAATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	19
teLimE2(P-1G)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGACCATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	20
teLimE2(P-1H)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGATGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	21
teLimE2(P-1I)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGAATATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	22
teLimE2(P-1K)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGCTTATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	23
teLimE2(P-1L)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGCAGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	24
teLimE2(P-1M)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGCATATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	25
teLimE2(P-1N)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGATTATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	26
teLimE2-R1	ACACGGAATTTCTTCATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	27
teLimE2(P-1Q)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGTTGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	28
teLimE2(P-1R)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGACGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	29
teLimE2(P-1S)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGAGAATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	30
teLimE2(P-1T)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGGGTATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	31
teLimE2(P-1V)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGAACATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	32
teLimE2(P-1W)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGGCAATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	33
teLimE2(P-1Y)-R1	ACACGGAATTTCTTCATGATAATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	34
teLimE2-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTTCATG	35
teLimE2(E+1A)-R1	TGCATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	36
teLimE2(E+1D)-R1	GTCATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	37
teLimE2(E+1F)-R1	AAAATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	38
teLimE2(E+1G)-R1	ACCATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	39
teLimE2(E+1H)-R1	ATGATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	40
teLimE2(E+1I)-R1	AATATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	41
teLimE2(E+1K)-R1	CTTATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	42
teLimE2(E+1L)-R1	CAGATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	43
teLimE2(E+1M)-R1	CATATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	44
teLimE2(E+1N)-R1	ATTATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	45
teLimE2(E+1P)-R1	CGGATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	46
teLimE2(E+1Q)-R1	TTGATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	47
teLimE2(E+1R)-R1	ACGATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	48
teLimE2(E+1S)-R1	AGAATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	49
teLimE2(E+1T)-R1	GGTATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	50
teLimE2(E+1V)-R1	AACATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	51
teLimE2(E+1W)-R1	GCAATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	52
teLimE2(E+1Y)-R1	ATAATGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	53

[0168]

[表7-2]

名前	塩基配列 (5' to 3')	配列番号
teLimE2(E+1A)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGCATGCGGATAACGCATG	54
teLimE2(E+1D)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGCATGCGGATAACGCATG	55
teLimE2(E+1F)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCAAAATGCGGATAACGCATG	56
teLimE2(E+1G)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCACATGCGGATAACGCATG	57
teLimE2(E+1H)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTTCATGATGCGGATAACGCATG	58
teLimE2(E+1I)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCAATATGCGGATAACGCATG	59
teLimE2(E+1K)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTTATGCGGATAACGCATG	60
teLimE2(E+1L)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCAGATGCGGATAACGCATG	61
teLimE2(E+1M)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCATATGCGGATAACGCATG	62
teLimE2(E+1N)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTTCATTATGCGGATAACGCATG	63
teLimE2(E+1P)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCGGATGCGGATAACGCATG	64
teLimE2(E+1Q)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTTGATGCGGATAACGCATG	65
teLimE2(E+1R)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCAGATGCGGATAACGCATG	66
teLimE2(E+1S)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCAGATGCGGATAACGCATG	67
teLimE2(E+1T)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGGATGCGGATAACGCATG	68
teLimE2(E+1V)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCAACATGCGGATAACGCATG	69
teLimE2(E+1W)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCGATGCGGATAACGCATG	70
teLimE2(E+1Y)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCCATATGCGGATAACGCATG	71
teMP(18aa)-R1	CCGGAATTTCTGCATGAGAATATGCTTGACCAACACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	72
teMP(16aa)-R1	CCGGAATTTCTGCATGAGAATATGCTTGACCAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	73
teMP(14aa)-R1	CTGCATGAGAATATGCTTGACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	74
teMP(13aa)-R1	CTGCATGAGAATATGCTTGACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	75
teMP(12aa)-R1	TTTCTGCATGAGAATATGCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	76
teMP(11aa)-R1	TTTCTGCATGAGAATATGCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	77
teMP(10aa)-R1	GAATTTCTGCATGAGAATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	78
teMP(9aa)-R1	GAATTTCTGCATGAGAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	79
teMP(8aa)-R1	AATTTCTGCATGAGAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	80
teMP(7aa)-R1	ACATTCTGCATGAGAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	81
teMP(6aa)-R1	TTAACATGCATGAGAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	82
teMP(5aa)-R1	CGAAGCTTAACATGCATGAGACATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	83
teMP(4aa)-R1	CGAAGCTTAACAATGAGACATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	84
teMP(3aa)-R1	CGAAGCTTAACAATGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	85
teMP(18aa)-R2	CGAAGCTTAACAACGTTCTGCTTCCGGAATTTCTGCATGAGAAT	86
teMP(16aa)-R2	CGAAGCTTAACAACGTTCTGCTTCCGGAATTTCTGCATGAGAATATG	87
teMP(14aa)-R2	CGAAGCTTAACATGCTTCCGGAATTTCTGCATGAGAATATGCTT	88
teMP(13aa)-R2	CGAAGCTTAACATGCTTCCGGAATTTCTGCATGAGAATATGCTT	89
teMP(12aa)-R2	CGAAGCTTAACATGCTTCCGGAATTTCTGCATGAGAATATGCAC	90
teMP(11aa)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGCATGAGAATATGCAC	91
teMP(10aa)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGCATGAGAATAA	92
teMP(9aa)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTGCATGAGAACGC	93
teMP(8aa)-R2	CGAAGCTTAACAATTTCTGCATGAGAACGCAT	94
teMP(7aa)-R2	CGAAGCTTAACATTCTGCATGAGAACGCATG	95
teMP(6aa)-R2	CGAAGCTTAACATGCATGAGAACGCAT	96
teMP(5aa)-R2	CGAAGCTTAACATGCATG	97
teMP(4aa)-R2	CGAAGCTTAACAATGAGA	98
teMP(3aa)-R2	CGAAGCTTAACAATGCAT	99

[表7-3]

名前	塩基配列 (5' to 3')	配列番号
teR1-R1	ATTCATGCGGATAACGCGGAATCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	100
teR2-R1	ACCAATGGGTGTCAACATTACAGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	101
teR3-R1	AGAAGCATCAAACAAAGACATGTTTTCTCCTTGTTAAAGTTA	102
teR4-R1	AAACTGAGACGAACCATAAAGCAAATACATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	103
teR5-R1	ACGGATGCGGCGGAACAATAAGATACATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	104
teR1-R2	CGAAGCTTAACATTCATGCGGATAACGCGGA	105
teR2-R2	CGAAGCTTAACAACCCGGACCAGACCAATGGGTGTCACCATTC	106
teR3-R2	CGAAGCTTAGCAACTATAATTAGCAATATAATGTTGAGAAGCATCAAACAAA	107
teR4-R2	CGAAGCTTAGCACTGCGGAATATGCCAAAAGTACGACGAACCATAA	108
teR5-R2	CGAAGCTTAGCACTCCCGAGGATACGGATGCGGCGGAACAATAA	109
teR1(P-1K)-R1	ATGCTTATAACGCGGAATCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	110
teR2(W+1P)-R1	ACGGATGGGTGTCAACATTACAGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	111
teR5(P+1A)-R1	ATGCATGCGGCGGAACAATAAGATACATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	112
teR1(P-1K)-R2	CGAAGCTTAACATTCATGCTTATAACGCGGAATC	113
teR2(W+1P)-R2	CGAAGCTTAACAACCCGGACCAGACGGATGGGTGTCACCATTC	114
teR3(E-1S)-R2	CGAAGCTTAGCAACTATAATTAGCAATATAATGAGAAGAAGCATCAAACAAA	115
teR4(W-1A)-R2	CGAAGCTTAGCACTGCGGAATATGTGCAAAAGTACGACGAACCATAA	116
teR5(P+1A)-R2	CGAAGCTTAGCACTCCCGAGGATATGCATGCGGCGGAACAATAA	117
teLimE2-CAC-R1	GAATTTCTTCGTGCGGATAACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	118
teLimE2-CAC-R2	CGAAGCTTAACACGGAATTTCTTCGTGCGGAT	119
teR6-R1	AAGCTTAACACGGAATATAGGTATGATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	120
teR6-H5A-R1	GAATATAGGTTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	121
teR6-H5A(T-1A)-R1	GAATATAGCTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	122
teR6-H5A(T-1D)-R1	GAATATAGTCTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	123
teR6-H5A(T-1E)-R1	GAATATATTCTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	124
teR6-H5A(T-1F)-R1	GAATATAAATGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	125
teR6-H5A(T-1G)-R1	GAATATAACCTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	126
teR6-H5A(T-1H)-R1	GAATATAATGTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	127
teR6-H5A(T-1I)-R1	GAATATAAATTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	128
teR6-H5A(T-1K)-R1	GAATATACTTTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	129
teR6-H5A(T-1L)-R1	GAATATACAGTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	130
teR6-H5A(T-1M)-R1	GAATATACATTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	131
teR6-H5A(T-1N)-R1	GAATATAATTTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	132
teR6-H5A(T-1P)-R1	GAATATACGGTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	133
teR6-H5A(T-1Q)-R1	GAATATATTGTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	134
teR6-H5A(T-1R)-R1	GAATATAACGTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	135
teR6-H5A(T-1S)-R1	GAATATAAGATGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	136
teR6-H5A(T-1V)-R1	GAATATAAACTGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	137
teR6-H5A(T-1W)-R1	GAATATACCATGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	138
teR6-H5A(T-1Y)-R1	GAATATAATATGCATTACCACGCATGTTTTCTCCTTGTTAAAG	139

[0170]

[表7-4]

名前	塩基配列 (5' to 3')	配列番号
teR6-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAG	140
teR6-H5A-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAGGTTGCATTACC	141
teR6-H5A(T-1A)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATATGCTGCATTACC	142
teR6-H5A(T-1D)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAGTCTGCATTACC	143
teR6-H5A(T-1E)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATATTCTGCATTACC	144
teR6-H5A(T-1F)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAAAATGCATTACC	145
teR6-H5A(T-1G)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAACCTGCATTACC	146
teR6-H5A(T-1H)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAATGTGCATTACC	147
teR6-H5A(T-1I)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAAATTGCATTACC	148
teR6-H5A(T-1K)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATACTTTGCATTACC	149
teR6-H5A(T-1L)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATACAGTGCATTACC	150
teR6-H5A(T-1M)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATACATTGCATTACC	151
teR6-H5A(T-1N)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAATTTGCATTACC	152
teR6-H5A(T-1P)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATACGGTGCATTACC	153
teR6-H5A(T-1Q)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATATTGTGCATTACC	154
teR6-H5A(T-1R)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAACGTGCATTACC	155
teR6-H5A(T-1S)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAAGATGCATTACC	156
teR6-H5A(T-1V)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAAACTGCATTACC	157
teR6-H5A(T-1W)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATACCATGCATTACC	158
teR6-H5A(T-1Y)-R2	CGAAGCTTAACACGGAATATAATATGCATTACC	159

[0171] [1. プレニル基転移酵素の探索]

(配列類似性ネットワーク (SSN) の生成方法)

SSNは、Blastp解析で得られたヒット配列を用いて、Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST) (Zallot, R.; Oberg, N.; Gerlt, The EFI web resource for genomic enzymology tools: leveraging protein, genome, and metagenome databases to discover novel enzymes and metabolic pathways. Biochemistry, 2019, 58 (41), 4169-4182.; Gerlt, J. A.; Bouvier, J. T.; Davidson, D. B.; Imker, H. J.; S adkhin, B.; Slater, D. R.; Whalen, K. L. Enzyme function initiative-enzyme similarity tool (EFI-EST): a web tool for generating protein sequence similarity networks. BBA. PROTEINS AND PROTEOMICS, 2015, 1854 (8), 1019-1037.) により生成した。アラインメントスコアを適宜設定してノードを作成し、得られたネットワークをCytoscape 3. 8. 2によって可視化し、異なる機能を有するPTaseをクラスター化した。クエリとしては、後述するように、Kg p F又はLim Fを用いた。

[0172] (系統樹解析方法)

系統樹の作成は以下のようにして行った。まず、公知のシアノバクチン P T a s e 配列を N C B I データベースからダウンロードした。それらの配列を M E G A 7.0 (Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, Mol. Biol. Evol., 2016, 33 (7), 1870-1874.) を用いてアラインメントし、次に 10000 回のブートストラップ複製を用いてこのアラインメントに基づく最尤系統樹を作成した。

[0173] (検討)

C-プレニル化活性を有する潜在的ペプチド P T a s e を探索するために、Basic Local Alignment Search Tool (B L A S T) を用いて、唯一の既知シアノバクチン C-P T a s e である K g p F に相同なタンパク質を検索した。得られたヒットについて、配列-機能の相関関係を予測するために、アラインメントスコアを 10^{-86} に設定して配列類似性ネットワーク (S S N) を作成した。得られた S S N により、T y r O-プレニル化、末端 N- / O-プレニル化、A r g N-プレニル化、及び T r p N- / C-プレニル化を含む、推定された機能を有するクラスター、並びに機能が特定されなかったクラスターを見出した (図 1 a)。

[0174] 未同定タンパク質の中で、いずれのクラスターにも属さなかった L i m n o t h r i x s p. C A C I A M 69 d 由来のタンパク質に注目した。このタンパク質を、他の既知シアノバクチン P T a s e と比較して系統樹解析したところ、T y r O-P T a s e と T r p C- / N-P T a s e との間に独立したクレードを形成することが明らかになった (図 2 a)。このタンパク質は、以前の報告 (Lima, A.R.J. et al. Insights Into Limnothrix sp. Metabolism Based on Comparative Genomics, Front. Microbiol., 9(2018).) で P i r F (T y r O-P T a s e) のホモログとして言及されていたが、S S N 及び系統発生分析の両方とも、このタンパク質が独特の活性を示すことを示唆した。そこで、このタンパク質を L i m F と命名し、

さらに研究することにした。

[0175] LimF 遺伝子は、シアノバクチンプロテアーゼ (LimA) 及び大環状化酵素 (LimG) 並びに前駆体と推定されるペプチド (LimE1 及び LimE2) を含む典型的なシアノバクチン BGC に含まれていた (図 2 b 及び表 8)。手動で遺伝子を探索した結果、離れた位置にある遺伝子座にコードされている別の前駆体候補 (LimE3) も見出された。LimE1-3 ペプチドは、以前に同定されたシアノバクチン前駆体 (Donia, M.S., Schmidt, Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. Chem. Biol., 18, 508-519 (2011).) と顕著な類似性を共有していた。それらの配列アラインメント分析により、LimA 及び G の認識配列 (RSII 及び RSIII) を見出した (図 2 c)。

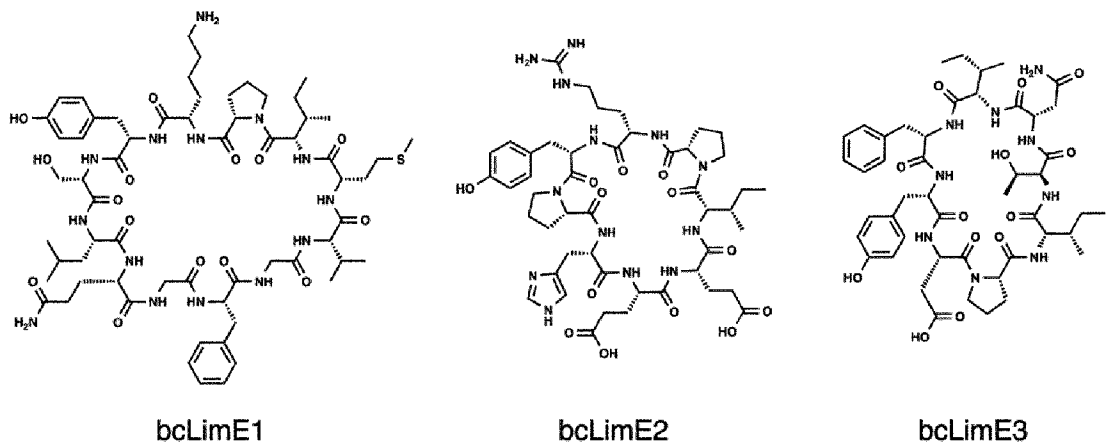
[0176] [表8]

Protein	Accession	Predicted Function	Closest match		
			Accession	Identity (%)	Organism
LimA	RFP52076.1	N-Terminal protease	NEQ67225.1	75.43	<i>Symploca sp. SIO2D2</i>
LimB	RFP52077.1	Hypothetical protein	MBE5231170.1	75.38	<i>Microcystis aeruginosa PMC 728.11</i>
LimC	RFP52078.1	Hypothetical protein	OJJ24754.1	60.87	<i>Roseofilum reptotaenium AO1-A</i>
LimE1	RFP52073.1	Precursor	TRU48195.1	62.50	<i>Microcystis aeruginosa Ma_QC_Ca_00000000_S207</i>
LimE2	N/A	Precursor	MBE5231160.1	66.67	<i>Microcystis aeruginosa PMC 728.11</i>
LimE3	N/A	Precursor	NCR01836.1	60.42	<i>Microcystis aeruginosa L211-11</i>
LimF	RFP52075.1	Prenyltransferase	NER99685.1	68.21	<i>Symploca sp. SIO1B1</i>
LimG	RFP52079.1	C-terminal macrocyclase	NER98176.1	71.86	<i>Symploca sp. SIO1B1</i>

[0177] シアノバクチンの一般的な生合成経路では、Aファミリープロテアーゼが N 末端の RSII を切り離し、その後 G ファミリー大環状化酵素が C 末端の RSII を切断しながらコアペプチド (CP) 領域を環状化することで、主鎖環状化ペプチドが生産される (Sarkar, S., Gu, W. & Schmidt, Expanding

the chemical space of synthetic cyclic peptides using a promiscuous macrocyclase from prenylagaramide biosynthesis. ACS Catal., 10, 7146–7153 (2020).)。一般に、得られた環状コアペプチドは、P T a s eを含む他の修飾酵素 (tailoring enzyme) によってさらに修飾され、最終的なシアノバクチン生成物を与える。他のシアノバクチン生合成遺伝子クラスター及び保存されたR Sモチーフとの類似性に基づき、L i m E 1–3ペプチドのC P領域を同定し、また、それらが主鎖大環状化されたペプチド群 (b c L i m E 1、b c L i m E 2、及びb c L i m E 3。その構造を以下の表9に示す。) が、L i m Fの基質になり得ると仮定した。

[0178] [表9]



[0179] また、L i m Fをクエリとして用いたB L A S T p解析でヒットしたタンパク質配列について、アラインメントスコアを 10^{-70} に設定してS S N解析を行った。その結果、L i m Fと同一のクラスターを形成したタンパク質を新たに11種類見出した (図1 b)。それらの配列を配列番号2~12として表1に示す。

以上から、これら11種のタンパク質がL i m Fと同様の機能を有していることが強く示唆された。中でも、S y m p l o c a s p. S I O 1 B 1に由来する配列番号2のタンパク質は、L i m Fと同様の機能を有している蓋然性が最も高いと推定された。

[0180] [2. L i m Fの酵素活性評価]

L i m Fの酵素活性を調べるために、L i m Fを上述の方法により大腸菌

で異種発現させ、 $MgCl_2$ 及びプレニル基ドナー（ゲラニルピロリン酸（GPP））の存在下で、化学合成したbcLimE1、bcLimE2、又はbcLimE3とインキュベートした。反応条件は後述する条件とした。反応混合物のLC-MS分析では、bcLimE2がゲラニル化に相当する分子量増加（+136Da）を伴った生成物に定量的に変換されたことが示された（図3a）。ゲラニル化bcLimE2のMS/MS分析は、LimF処理によりHis残基がゲラニル化されることを示唆した（図4）。一方、bcLimE1及びbcLimE3は、この条件において、LimFによるゲラニル化を受けなかった。

[0181] LimF修飾されたbcLimE2をHPLCで精製し、COSY及びHMBCを含む1D及び2D NMR分析を行った。ゲラニル基とイミダゾールC2炭素の間に観測されたHMBC相関から、ゲラニル化の末端メチレンがHis側鎖のC2位置に結合した構造（フォワードゲラニル化）が示された（図3b）。以上から、LimBGC産物として推定されるlimnotamideの構造が同定された（図3b）。また、LimFがHis側鎖のC2位炭素をフォワードゲラニル化する独特なPTaseであることが明らかにされた。

[0182] LimFの生化学的特性を検討するために、種々の反応条件下で、LimFによるbcLimE2の*in vitro*修飾を実施した。

まず、プレニル基ドナーとして、ゲラニルピロリン酸に代えて、ファルネシルピロリン酸を用いて上記と同様の実験を行った。その結果、GPPを用いた場合よりも低効率ではあるものの、微量のファルネシル化bcLimE2が生成した。

[0183] また、後述する種々の条件で反応を行ったところ、LimFは Mg^{2+} イオンに明確な依存性を示し、比較的広い温度及びpH耐性を示した（図5a-c）。様々なインキュベーション時間及びGPP/ Mg^{2+} 濃度を用いた実験（図5d-f）に基づき、LimF反応条件を最適化した。

最適化条件は以下のとおりである：1 mM GPP、40 mM $MgCl_2$

、1 mM ジチオトレイトール (DTT)、pH 7.2、反応温度 25 °C。以下、他に記載した場合を除き、上記反応条件を用いた。

[0184] 最適条件下で、LimFによるbcLimE2のプレニル化反応の定常状態速度論パラメータを、後述の方法により測定した。結果は以下のとおりである： $k_{cat} = 13.8 \pm 0.6 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_m = 0.313 \pm 0.039 \text{ mM}$ (表10、図5g)。これは、LimFが触媒回転率の点で最も効率的なシアノバクチンPTaseの1つであることを示している。

[0185] 興味深いことに、LimFは、生来の基質であるbcLimE2だけでなく、His単量体 (H-His-OH、及びFmoc-His-OH) 及びHis含有ジペプチド (Ac-AH-NH₂) を、それぞれ中程度の修飾効率及び高効率でプレニル化することが示された。その効率を以下の表に示す。

[0186] [表10]

基質	プレニル基ドナー	修飾効率 %
Fmoc-His	GPP	15.2 ± 0.8%
Free His	GPP	34.9 ± 0.7%
Ac-AH-NH ₂	GPP	>99%

100 μM LimFで20時間反応を行った。

[0187] 上記表10に記載の基質がゲラニル化された化合物において、そのゲラニル化構造がlimnothamideと同じであることを検証するために、LimFによってゲラニル化したAc-AH-NH₂を精製し、NMRにより解析した。観測されたCOSY及びHMBC相関は、bcLimE2と同様に、His C2位置のフォワードゲラニル化を支持した。これらの結果から、LimFは基質の配列許容性が極めて高い一方で、厳密な位置選択性を有することが示唆された。

[0188] さらに、Ac-AH-NH₂だけでなく種々のHis含有ジペプチドについて、20 μM LimFによるプレニル化反応を適用したところ、種々のHis含有ジペプチドについてLimFによるHisプレニル化反応が進行することが明らかになった (図6)。

[0189] (合成基質とLimFとの反応方法)

推定基質 (bcLimE1、bcLimE2、及びbcLimE3) を用いたLimFの初期評価は、以下のとおり行った。酵素反応をLimF (20 μ M)、ペプチド基質 (200 μ M)、プレニル基ドナー (ゲラニルピロリン酸又はファルネシルピロリン酸) (2 mM)、HEPES (50 mM、pH 7.5)、MgCl₂ (20 mM)、及びDTT (1 mM) の条件下、37℃で12時間行った。基質bcLimE1、bcLimE2、及びbcLimE3をそれぞれ37℃で12時間反応させた後、9倍量の1% TFAを加え、4℃で遠心分離 (15300 $\times$ g、10分間) して上清を回収した。得られた上清10 μ LをLC-MS分析に供した。

[0190] (ラージスケールLimF反応の方法)

NMR分析に供するアナライトは以下のようにして調製した。

ゲラニル化bcLimE2は、20 μ Lスケールの反応を100本並列して25℃で30時間行うことで調製した。反応は、LimF (50 μ M)、bcLimE2 (2 mM)、GPP (2.5 mM)、HEPES (50 mM、pH 7.5)、MgCl₂ (100 mM)、1 mM DTT、及びDMSO (4%、v/v) の条件下で行った。反応完了後の各反応溶液をまとめ、2 mLのメタノール (MeOH) と加え、氷上で30分間インキュベートした後、遠心分離 (15300 $\times$ g、10分間) によって上清を回収した。次いで、上清を9倍量の水で希釈し、濾過した後、分取逆相HPLCに注入し精製した。60分間にわたる1~60%緩衝液Bの直線勾配を分離に使用した。ゲラニル化bcLimE2を含む画分 (~2.0 mg) をまとめ、LC-MSで純度を確認した後、乾燥し、NMR分析のために重メタノール (CD₃OD) に再懸濁した。

上述又は後述のゲラニル化AHジペプチド及びATYトリペプチドを得る場合も、酵素反応及び精製を上記と同様に行った。

[0191] (LimFの生化学的特性評価方法)

LimFによるbcLimE2プレニル化反応における温度、pH、及び

金属イオンの影響は、以下のように検討した。標準的な反応条件は以下のとおりとした： $1\ \mu\text{M}$ LimF、 $1\ \text{mM}$ GPP、 $40\ \text{mM}$ MgCl_2 、 $50\ \text{mM}$ HEPES pH 7.5、DMSO (4%、v/v)、 $1\ \text{mM}$ DTT、 $0.1\ \text{mM}$ 基質、反応温度 30°C 、及び反応時間 60 分間。反応温度、pH、金属イオンの種類及び濃度については適宜変更した。反応後、9 倍量の 1% TFA の添加した後に、上清を LC-MS 分析に供した。

LimF の時間経過実験では、反応を 25°C でインキュベートし、各時点で 9 倍量の 1% TFA の添加することで反応を停止した。プレニル化効率 は、他に記載がない限り、 $(\text{生成物のピーク面積} / (\text{生成物のピーク面積} + \text{基質のピーク面積})) \times 100 (\%)$ として算出した。

[0192] LimF による bcLimE2 プレニル化反応における、GPP 及び MgCl_2 の濃度依存性は、 $1\ \mu\text{M}$ LimF、 $1\ \text{mM}$ 又は適宜変更した濃度の GPP、 $50\ \text{mM}$ HEPES pH 7.2、 $0.4\ \text{mM}$ 基質、 $1\ \text{mM}$ DTT、及び $40\ \text{mM}$ 又は適宜変更した濃度の MgCl_2 を含む反応系で測定した。GPP 以外の成分を含む反応液を調製し、 25°C に予熱した後に、GPP を添加することで反応を開始した。 25°C でインキュベートした後、各時点で反応を停止し、LC-MS で分析した。次に、線形領域におけるプレニル化産物の生成量増加の傾きとして初期速度を計算した。各条件下において、3 つの個別の反応を実施し、それらの結果の平均と標準偏差を解析に用いた。

GPP 濃度依存性及びペプチド基質濃度依存性については、初期速度、並びに GPP 基質濃度あるいはペプチド基質濃度を Graphpad Prism 8.4.2 (GraphPad Prism Software Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ) ソフトウェアの Michaelis-Menten モデルにフィッティングさせて、速度論パラメータを推定した。

MgCl_2 濃度依存性 (K_{Mg}) については、初期速度、並びに MgCl_2 濃度を、以下の式：

[数1]

$$v = V_{\max}[\text{Mg}^{2+}]/(K_{\text{Mg}} + [\text{Mg}^{2+}])$$

にフィッティングさせて速度論パラメータを推定した。

後述するL i m FのT y rプレニル化活性の評価については、基質としてt e R 6－H 5 Aを用いて5 μ M L i m Fにより同様の反応を行った。

[0193] (L i m Fの定常状態速度論パラメータの測定方法)

L i m FによるH i s－プレニル化反応の速度論パラメータは、異なる濃度の基質を用いた最適条件下での反応から決定した。後述のT y r－プレニル化については、L i m Fを5 μ Mに、反応温度を16℃にしたこと以外は同一条件で速度論パラメータを測定した。速度論パラメータを推定するために、初期速度及び基質濃度をG r a p h p a d P r i s m 8. 4. 2ソフトウェアのM i c h a e l i s－M e n t e nモデルにフィッティングした。

[0194] [3. F I T－L i m Fシステムによる多様なプレニル化t e M Pのi n v i t r o合成]

チオエーテル閉環環状ペプチド (t e M P) は、望みの標的タンパク質に対する新規ペプチドリガンドの開発に用いられており、注目すべき実績によりその有用性が証明されている (Huang, Y., Wiedmann, M.M. & Suga, RNA display methods for the discovery of bioactive macrocycles. Chem. Rev., 119, 10360-10391 (2018).; Goto, Y. et al. Reprogramming the translation initiation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides. ACS Chem. Biol., 3, 120-129 (2008).)。

そこで、次に、L i m Fが非天然のt e M P骨格上にあるH i s残基を修飾することができるかどうかを検証した。

[0195] まず、b c L i m E 2の配列を模倣したt e M P (t e L i m E 2)を設計し、カスタムした無細胞翻訳、いわゆるフレキシブルi n v i t r o翻訳 (F I T) システム (Goto, Y., Katoh, T. & Suga, Flexizymes for genetic code reprogramming. Nat. Protoc., 6, 779-790 (2011).) を用いて遺

伝暗号リプログラミングによって発現させた。具体的には、AUG開始コドンにN-クロロアセチル-L-フェニルアラニン (ClAcD-F) でリプログラミングし、N末端にクロロアセチル基 (ClAc基) を有する直鎖前駆体を発現させ、下流のCysチオールとの自発的な閉環S_N2反応によりチオエーテル結合を形成させた (図7a)。なお、FITシステムは、後述する組成とした。

*in vitro*で発現させたteLimE2を100 μM LimF存在下、25℃で16時間インキュベートし、LC-MSにより分析した。クロマトグラムはゲラニル化生成物 (teLimE2-H^{Ger}) に対応するピークを示し、LimFによるteLimE2のプレニル化が成功したことを示した (図7a)。以下、LimFを共役させた*in vitro*翻訳系をFIT-LimFシステムと呼ぶ。

[0196] FIT-LimFシステムは、種々の基質を容易に調製でき、それに続いてLimFによるプレニル化をワンポット法で実施できる。したがって、FIT-LimFシステムによれば、LimFの広範な基質許容性に関する検討が容易である。RiPP酵素は修飾部位近傍の局所配列環境に影響される場合があるため、プレニル化部位近傍の残基を変更した種々の基質についてLimFによるプレニル化効率を調査した。なお、FIT-LimFシステムは、後述の構成とした。

[0197] His-1及びHis+1の位置を、Cys以外の19種類のタンパク質性アミノ酸に置換した38種のteLimE2変異体を設計し、FIT-LimFシステムで発現・修飾し、反応結果をLC-MSで分析した。本実験においては、低いLimF濃度 (10 μM) を用いることで、意図的に修飾効率が悪い条件下でプレニル化工程を行った。これにより、His-1及びHis+1のアミノ酸の影響をより正確に調査することができる。

[0198] His-1変異体シリーズは、LimFがこの位置に対して弱い選択性を有する傾向があることを示唆した。具体的には、-1位にThr/AIa/Met/Pro/Ser/Valのような比較的小さい、あるいは疎水性の

残基を持つ基質は、非常に効率よくL i m Fによるプレニル化を受けたが、
− 1 位に嵩高い、あるいは荷電した残基を有する基質はL i m Fによるプレ
ニル化の効率が比較的低かった（図 7 b）。一方、+ 1 位については、P r
oのみがプレニル化効率が低く、+ 1 位のアミノ酸は非常に可変であった（
図 7 c）。同様の傾向が別の配列を有する環状ペプチドでも確かめられた（
図 7 f）。これにより、異なるH i s前後配列をもつ基質における、L i m
Fによる修飾効率の違いに関する知見を得た。

[0199] 次の一連の実験では、種々の環サイズのt e M PがL i m Fによって許容
されるかどうかを調べた。異なる環サイズ（4～18残基）で、好ましい局
所配列モチーフ（S e r－H i s－A l a／C y s）を有する13種のt e
M P変異体を設計した。F I T－L i m Fシステム（L i m F濃度：10 μ
M）によるこれらのt e M Pのワンポット発現及び修飾は、これらのすべて
が定量的プレニル化を受けることを示した（図 7 d）。以上のことから、L
i m Fが環サイズに関係なくt e M Pをプレニル化できることを実証した。

[0200] 次に、L i m Fが多様なランダム配列のt e M Pを修飾できることを実証
した。F I T－L i m Fシステム（L i m F濃度：10 μM）を用いて、ラ
ンダム配列からなる5つのt e M Pを発現させ、修飾した（図 7 e）。試験
した5つのt e M Pのうち、L i m Fのプレニル化に有利な− 1 及び+ 1 残
基を有する2つのt e M P（t e R 1 及びt e R 2）は、定量的プレニル化
を受けた。これらのt e M Pの隣接残基（− 1 又は+ 1 残基）を不利なアミ
ノ酸に変異させた基質においては、予想通り、L i m F修飾の効率が抑制さ
れた（t e R 1（P－1 K）及びt e R 2（W+1 P））。一方、t e R 3
、t e R 4、及びt e R 5ペプチドのプレニル化効率は中程度又は低程度で
あったが、H i sに隣接する残基を好ましい側鎖で置換することで、L i m
Fによる修飾効率が大幅に向上した（t e R 3（E－1 S）、t e R 4（W
－1 A）、及びt e R 5（P+1 A））。

[0201] 以上のことから、L i m Fは、その長さ及び全体的な配列構成に関係なく
、主にH i s残基近傍の局所配列環境に依存して、多様なt e M Pをプレニ

ル化できることを示した。F I T-L i m F システム (L i m F 濃度 : 20 μ M) を用いた、別の配列を有する環状ペプチドのプレニル化でも同様の傾向が確かめられた (図 8 a)。

[0202] さらに、基質が複数のプレニル化を受容する部分を含む場合に、プレニル基が複数導入されることを実証した。F I T-L i m F システム (L i m F 濃度 : 20 μ M) を用いて、ランダム配列からなる 5 つの t e M P を発現させ、修飾した (図 8 b)。H i s 残基を 2 つ有する環状ペプチドでは、主要なモノプレニル化産物及び副次的なジプレニル化産物が得られた。また、H i s 残基を 3 つ有する環状ペプチドでは、主要なジプレニル化産物及び副次的なモノプレニル化産物が得られた。以上のことから、F I T-L i m F システムは、複数のプレニル基を有する環状ペプチドを産生できることが実証された。

[0203] (F I T-L i m F システムの構成)

転写共役 i n v i t r o 翻訳系 (transcription-coupled in vitro translation system) は、以下の成分を含む構成とした : 500 μ M の各タンパク質性アミノ酸 (メチオニンを除く)、50 mM の H E P E S - K O H (pH 7.6)、12 mM の M g (O A c)₂、100 mM の酢酸カリウム、2 mM の s p e r m i d i n e、1 mM の D T T、20 mM のクレアチンリン酸 (ロッシュ社)、2 mM の A T P、2 mM の G T P、1 mM の C T P、1 mM の U T P、0.1 mM の 10-ホルミル-5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸、1.5 mg/ml の大腸菌の全 t R N A (ロッシュ社)、0.73 μ M の A l a R S、0.03 μ M の A r g R S、0.38 μ M の A s n R S、0.13 μ M の A s p R S、0.02 μ M の C y s R S、0.06 μ M の G l n R S、0.23 μ M の G l u R S、0.09 μ M の G l y R S、0.02 μ M の H i s R S、0.4 μ M の I l e R S、0.04 μ M の L e u R S、0.11 μ M の L y s R S、0.03 μ M の M e t R S、0.68 μ M の P h e R S、0.16 μ M の P r o R S、0.04 μ M の S e r R S、0.09 μ M の T h r R S、0.03 μ M の T r p R S、0.02 μ M の T

y r R S、0.02 μ MのV a l R S、0.6 μ MのM T F、2.7 μ MのI F 1、0.4 μ MのI F 2、1.5 μ MのI F 3、0.26 μ MのE F - G、10 μ MのE F - T u、0.66 μ MのE F - T s、0.25 μ MのR F 2、0.17 μ MのR F 3、0.5 μ MのR R F、0.1 μ MのT 7 R N Aポリメラーゼ、0.1 μ Mのヌクレオチドニリン酸キナーゼ、4 μ g / m lのクレアチンキナーゼ、3 μ g / m lのミオキナーゼ、0.1 μ Mのピロホスファターゼ、及び1.2 μ Mのリボソーム。

[0204] 上記の組成物に、DNA鋳型及びクロロアセチルアミノ酸がチャージされたtRNA^{fMet}_{CAU} (C l A c - D - P h e - tRNA^{fMet}_{CAU}又はC l A c - D - T y r - tRNA^{fMet}_{CAU})を、それぞれ0.04 μ M及び50 μ Mの最終濃度で添加した。次いで、混合物を37℃で1時間インキュベートして、翻訳及び自発的チオエーテル環形成を実施した。

後述するヒスチジンの非タンパク質性アミノ酸誘導体が組み込まれた基質については、同様のi n v i t r o翻訳反応をH i sなしで実施し、H i sアナログをチャージしたtRNA^{GluE2}_{GUG} (50 μ M)を添加した。

[0205] 本実施例のF l T - L i m Fシステムにおいて、他に記載した場合を除き、L i m Fによる反応は以下のようにして行った。

37℃で1時間反応させた後、翻訳混合物をL i m F酵素混合物とそれぞれ混合し、10 μ MのL i m F及び1 mMのG P Pを含む反応混合物を調製した。25℃で16時間インキュベートした後、45 μ Lの1% T F A水溶液を添加することにより反応を停止し、次いで、混合物を10分間氷上でインキュベートした。沈殿した画分を4℃での遠心分離 (15200 $\times$ g、10分間)により分離し、上清10 μ LをL C - M S分析に供した。

[0206] [4. F l T - L i m FシステムによるH i s誘導体を含むペプチドのプレニル化]

次に、プレニル化されるH i s残基を、類似の側鎖 (H i s誘導体)に置換した場合に、L i m Fによるプレニル化が進行するかどうかについて検討した。F l Tシステムによる遺伝暗号リプログラミングを利用し、H i s残

基が種々の非タンパク質性アミノ酸で置換された t e L i m E 2 誘導体を発現した (図 8 c)。具体的には、タンパク質性アミノ酸である L-H i s を、N π -及び N π -メチル化 H i s アナログ ($_L$ H i s (1-Me) 及び $_L$ H i s (3-Me))、チオフェン若しくはチアゾール側鎖を有するアミノ酸 ($_L$ A l a (2-Th i)、 $_L$ A l a (3-Th i)、及び $_L$ A l a (4-Th z))、D-H i s、又は α -メチル-H i s に置換した環状ペプチドを合成した。合成した各 t e L i m E 2 誘導体は、F I T-L i m F システム (L i m F 濃度: 100 μ M) を用いて修飾した。

[0207] コントロールとして、L-H i s を用いた遺伝暗号リプログラミングにより発現された t e L i m E 2 を用いた。当該 t e L i m E 2 は、標準的な遺伝暗号により翻訳された t e L i m E 2 と同等の効率で L i m F によりプレニル化され、これによりリプログラミングされた F I T-L i m F システムが良好に機能することを確認した。

[0208] 図 8 c に示すように、D-H i s 及び α -メチル-H i s を含む t e L i m E 2 誘導体 ($_D$ H i s 及び α (Me) $_D/_L$ H i s) は L i m F の良好な基質であった。しかしながら、L i m E 2 配列に取り込まれた N π -及び N π -メチル化 H i s アナログ ($_L$ H i s (1-Me) 及び $_L$ H i s (3-Me)) は L i m F によって全くプレニル化されなかった。また、チオフェン又はチアゾール側鎖を有する人工残基 ($_L$ A l a (2-Th i)、 $_L$ A l a (3-Th i)、及び $_L$ A l a (4-Th z)) も L i m F によってプレニル化されなかった。このことから、イミダゾール中の NH が L i m F による認識に関与している可能性が示唆された。

これらの結果は、H i s のイミダゾール部分が L i m F による認識に関与し、 α -置換及び立体配置を含む主鎖構造は重要な決定因子ではないことを示唆する。よって、種々の非天然プレニル化残基を有する t e M P を産生することができる F I T-L i m F システムの有用性を実証した。

[0209] [5. L i m F によるチロシン O-プレニル化]

様々なランダムな配列をもつ t e M P の評価の過程で、L i m F 処理後に

2つのプレニル化産物を与える t e M P (t e R 6) が偶然発見された (図 9 a)。当該ペプチドの H i s を A l a に置換した変異体 (t e R 6 - H 5 A) においても、プレニル化された生成物を与えた。このことは、L i m F が H i s 以外の残基にプレニル基を付加することを示している。H i s 以外の部位でプレニル化を受けた当該ペプチドにおける質量分析結果では、プレニル部分 (C ₁₀ H ₁₇) が解離したフラグメントに対応するピークが観察された (図 9 b)。このことはプレニル基がヘテロ原子上に存在することを示唆している (McIntosh, J.A., Donia, M.S., Nair, S.K. & Schmidt, Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria. J. Am. Chem. Soc., 133, 13698-13705 (2011).; Donia, M.S., Schmidt, Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. Chem. Biol., 18, 508-519 (2011).)。

[0210] 当該プレニル化ペプチドの M S / M S 分析により、7 番目の位置の T y r が L i m F によってプレニル化されていることが同定された (図 9 a)。簡単な N M R 解析のために、モデルトリペプチド A c - A T Y - N H ₂ を合成し、L i m F で修飾して、対応する T y r - プレニル化産物を得た。生成物の C O S Y 及び H M B C 相関は、プレニル化部位がフェノール性 O H 基であることを決定した (図 9 c)。以上のことから、L i m F が H i s - C - プレニル化及び T y r - O - プレニル化という2つの異なるプレニル化モードを触媒することができることが示された。

[0211] L i m F による T y r - プレニル化の局所的な配列選択性を調べるために、10 μ M L i m F 存在下、25 ° C 16 時間の反応条件で t e R 6 - H 5 A の一連の T y r - 1 変異体を試験した。その結果、H i s - プレニル化と類似の - 1 位の優先性を示した (図 9 d)。

[0212] L i m F による2つの異なるプレニル化モードについてさらに評価するために、効率的な H i s - プレニル化及び T y r - プレニル化をうける2つの t e M P (t e R 6 - H 5 A / Y 7 H、及び t e R 6 - H 5 A) をそれぞれ設計し、化学的に合成した。これらのペプチドを用いて、上記の方法により

速度論的解析を行った。得られた teR6-H5A/Y7H の His －プレニル化の K_m 及び k_{cat} 値は bcLimE2 の値と同等であり、閉環骨格の配列が触媒効率に有意に影響しないことを示唆した（表 11、項目 1 及び 2）。

[0213] さらに、上記の方法で、 GPP 又は Mg^{2+} 濃度を変化させて teR6-H5A の LimF 修飾を行うことにより、最大活性の半分の活性の発揮に必要な GPP 及び Mg^{2+} 濃度が、 Tyr －プレニル化と His －プレニル化とで類似していることが明らかになった（図 10a-e）。これにより、2つのプレニル化モードが同様の結合部位において触媒されている可能性が示唆された。しかし、 Tyr －プレニル化の k_{cat} 及び K_m 値は His －プレニル化よりも低く（表 11、項目 2 及び 3、図 10f）、 His －プレニル化が LimF の主要な機能であることが示唆された。ただし、 LimF による Tyr －プレニル化の触媒回転速度 ($k_{cat} = 1.0 \text{ min}^{-1}$) は、これまでに報告されたシアノバクチン PTase のいくつかと同等あるいは以上であり、 Tyr －プレニル化が LimF の二次的ではあるが有意な触媒活性であることを示している（表 12）。

[0214] [表11]

表：異なるプレニル化モードにおける LimF （野生型）及び LimF-H172L 変異体の定常状態の速度論パラメータ

項目	酵素	基質	プレニル化残基	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
1	LimF	bcLimE2	His	0.31 ± 0.04	13.8 ± 0.6	44.1
2	LimF	teR6-H5A/Y7H	His	0.58 ± 0.07	11.3 ± 0.6	19.4
3	LimF	teR6-H5A	Tyr	7.3 ± 1.8	1.0 ± 0.1	0.14
4	LimF-H172L	bcLimE2	His	1.7 ± 0.4	0.05 ± 0.01	0.03
5	LimF-H172L	teR6-H5A	Tyr	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1	0.68

[0215]

[表12]

機能	酵素名	基質	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)
Tyr C5 O-prenylation	PagF	<i>cyclo</i> [INPYLYP]	2.2x10 ⁻⁴	7.4
Tyr C5 O-prenylation	PagF	YYY	0.16	5.8
Tyr C5 O-prenylation	PagF	N-boc-L-Tyr	6.2	11
Trp C5 N-prenylation	AcyF	<i>cyclo</i> [TSQIWGSPVP]	3.32	9.50
Tyr C5 O-prenylation	LynF	N-boc-L-Tyr	14.0	1.06
Tyr C5 O- prenylation	LynF	<i>cyclo</i> [APMPYP]	4.2	0.22
Tyr C10 O-prenylation	PirF	<i>cyclo</i> [MSGVDYYP]	0.116	0.70
Tyr C10 O-prenylation	PirF	MSGVDYYPFAGDDAE	0.118	1.10
His C10 C-prenylation	LimF	<i>cyclo</i> [RYPHEEIP]	0.313	13.80
Tyr C10 O-prenylation	LimF	tecyclo[ρ FRGNATYIPC]	7.30	1.00
Tyr C10 O-prenylation	LimF-H172L	tecyclo[ρ FRGNATYIPC]	1.74	1.19
Aromatic C5 N-prenylation	FtmPT2 ⁸	12,13-dihydroxyfumitremorgin C	0.096	1.80
Aromatic C5 O-prenylation	Vib-PT ⁹	4-hydroxy-benzenemethanol	2.051	0.047
Aromatic C10 O-prenylation	Fmq26 ¹⁰	4-hydroxy-benzoate	5.60	0.14
Aromatic C10 O-prenylation	Fmq26 ¹⁰	flaviolin	0.021	0.013

[0216] 上記表 1 2 中、8 は、Grundmann, A.; Kuznetsova, T.; Afiyatullo, S. S.; Li, S.-M., FtmPT2, an N-Prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, Catalyses the Last Step in the Biosynthesis of Fumitremorgin B. *Chembiochem*, 2008, 9 (13), 2059–2063.、9 は、Bai, N.; Li, G.-H.; Luo, S.-L.; Du, L.; Hu, Q.-Y.; Xu, H.-K.; Zhang, K.-Q.; Zhao, P.-J., Vib-PT, an aromatic prenyltransferase involved in the biosynthesis of vibrallactone from *Stereum vibrans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020, 86 (10), e02687–19.、10 は、Haagen, Y.; Unsold, I.; Westrich, L.; Gust, B.; Richard, S. B.; Noel, J. P.; Heide, L., A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates. *FEBS Lett.*, 2007, 581 (

16), 2889-2893. より引用したものであることを意味する。

[0217] さらに、L i m Fが多様なランダム配列の t e M Pに含まれる T y rをO-プレニル化できることを確かめた。t e R 6-H 5 A/Y 7 Hとは別の配列を有するペプチドをF I T-L i m Fシステムで発現し、2 0 μ M L i m Fと1 6時間反応させたところ、T y r-プレニル化が確認された。また、このペプチドのT y rの-1位のアミノ酸残基をL i m Fによるプレニル化に有利なT h rに置換したところ、より高い効率でのT y r-プレニル化が確認された。

表1 3に、プレニル化した t e M Pの配列と、そのプレニル化効率を示す。表中、「y」はD-T y rを意味し、「tecy clo」は、N末端のアミノ酸（D-T y r）のクロロアセチル基と下流のC y sのチオール基との間で形成されるチオエーテル結合による環状構造を有することを意味する。また、表1 3に示される基質は、下線により示されるT y rがプレニル化された。

[0218] [表13]

基質	修飾効率 %
tecy clo [y I T N I T <u>Y</u> D P C]	2 1
tecy clo [y I T N I A <u>Y</u> D P C]	1

2 0 μ M L i m Fで1 6時間反応を行った。

[0219] [6. L i m Fの変異体の検討]

シアノバクチンP T a s eの一種であるP a g Fの結晶構造及び配列アラインメント分析の結果から基質イミダゾール環の近傍に位置することが推定された残基（G l u 5 4、A s p 7 0、及びH i s 1 7 2）の重要性を検証するために、部位特異的な変異導入実験を行った。シアノバクチンP T a s eの配列アラインメント分析は、G l u 5 4がFファミリーP T a s eの間で高度に保存されていることを示した。一方、A s p 7 0及びH i s 1 7 2はL i m Fに特有であったが、芳香族側鎖を修飾する他の既報のP T a s eはH i s 1 7 2の位置に保存された脂肪族残基（L e u、M e t、V a l）をもつことが明らかになった。

そこで、2つのG l u 5 4変異体（L i m F－E 5 4 A及びL i m F－E 5 4 Q）、1つのA s p 7 0変異体（L i m F－D 7 0 A）、及び3つのH i s 1 7 2変異体（L i m F－H 1 7 2 A、L i m F－H 1 7 2 F、及びL i m F－H 1 7 2 L）を後述の方法により調製し、上記のb c L i m E 2と反応させて、それらのH i s－プレニル化能を確認した。具体的には、1 0 0 μ Mのb c L i m E 2を、先に最適化された標準条件で、1 μ Mのw t－L i m F又は各L i m F変異体と2時間反応させた。

[0220] この結果、L i m F－D 7 0 A以外のL i m F変異体はプレニル化b c L i m E 2産物を全く、又はほとんど生成しなかった（図11）。このことから、G l u 5 4及びH i s 1 7 2がL i m FによるH i s－プレニル化に必須の役割を果たしていることが明らかになった。一方、L i m F－D 7 0 Aは野生型と同等のH i s－プレニル化能を示したことから、この残基はL i m FによるH i s－プレニル化に重要な役割をはたしていないことが明らかになった。

[0221] また、同様に、w t－L i m F及び各L i m F変異体によるt e R 6及びt e R 6－H 5 A基質の修飾を行い、それらのT y r－プレニル化能を評価した。反応は、基質としてt e R 6又はt e R 6－H 5 Aを用い、5 μ MのL i m Fで24時間反応させたこと以外は、b c L i m E 2のプレニル化と同様にした。

G l u 5 4変異体はT y r－プレニル化の消失をもたらした。この結果は、G l u 5 4がFファミリーP T a s eに強く保存されていることを考えると妥当である。対照的に、L i m Fの独特なH i sが、T y r－O－P T a s eで保存されているL e uに置き換わっているL i m F－H 1 7 2 Lでは、T y r含有基質について野生型L i m Fよりも良好な修飾効率を示した。L i m F－H 1 7 2 Lのさらなる定常状態速度論的アッセイにより、野生型よりもk c a t /K mが5倍増加することが確認され、そのT y r－プレニル化活性が増強されたことが確認された（表11、項目3及び5）。

G l u 5 4とH i s 1 7 2の両方が必須であるH i s－プレニル化とは対

照的に、H i s 1 7 2 は T y r - プレニル化に重要な役割を果たさず、むしろ L e u への変異は T y r - プレニル化活性を増強した。

[0222] (L i m F 変異体発現のための構築プラスミドの作製方法)

p E T 3 2 - L i m F - S M S プラスミドを、P C R に基づく部位特異的な変異導入のための鋳型として使用した。P C R 反応は、製造業者の手順に基づいて I n - F u s i o n (登録商標) H D C l o n i n g K i t (T a K a R a C l o n t e c h) を用いて実施した。プラスミドの配列は、サンガーシーケンスによって確認した。L i m F 変異体の精製には、野生型 (w t) L i m F の精製と同様のプロトコルを適用した。使用したプライマーを以下の表 1 4 に示す。

[0223] [表14]

プライマー	配列 (5' to 3')	配列番号
Lim-E54A-Forward	CATTATTGCGTGTTTCAGGCAAGATCAAACAAGACC	160
Lim-E54A-Reverse	GAACACGCAATAATGCAATCTCCGGTAGTTGCG	161
Lim-E54Q-Forward	CATTATTCAGTGTTTCAGGCAAGATCAAACAAGACC	162
Lim-E54Q-Reverse	GAACACTGAATAATGCAATCTCCGGTAGTTGCG	163
Lim-D70A-Forward	CGCATCCTTCTGCAGTTTAGCGATAA	164
Lim-D70A-Reverse	CTGCAGAAGGATGCGCGCAGGATACAG	165
Lim-H172L-Forward	TACCTTACTGATCGGCTTTGACTTCTACCTCG	166
Lim-H172L-Reverse	CCGATCAGTAAGGTATCAGAGCGCAGCATGG	167
Lim-H172F-Forward	TACCTTATTTATCGGCTTTGACTTCTACCTCG	168
Lim-H172F-Reverse	CCGATAAATAAGGTATCAGAGCGCAGCATGG	169
Lim-H172A-Forward	TACCTTAGCGATCGGCTTTGACTTCTACCTCG	170
Lim-H172A-Reverse	CCGATCGCTAAGGTATCAGAGCGCAGCATGG	171

[0224] [7 . L i m F による種々の化合物のプレニル化]

イミダゾール環を有する種々の低分子化合物、ペプチド及びタンパク質を基質として、L i m F によるプレニル化を実施した。

まず、L i m F が環状ペプチドのみならず、数個～数十個のアミノ酸からなる直鎖状ペプチドをプレニル化することを実証した。1つの環状ペプチドと、当該環状ペプチドのコア部分を保存した、長さの異なる3つの直鎖状ペプチドとを調製した。調製した各ペプチドは、ほぼ同等の効率でL i m F (2 0 μ M) によるプレニル化を受けた (図 1 2) 。このことから、L i m F によるプレニル化は環状ペプチドに限られず、幅広い範囲のペプチド又はタ

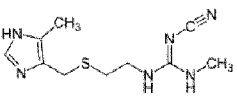
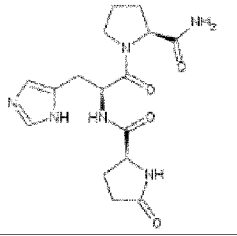
ンパク質に適用できることが示唆された。

[0225] 次に、既に医薬品として承認を受けている種々の化合物を含む、様々な低分子化合物、ペプチド、及びタンパク質についてLimFによるHis-プレニル化を実施した。具体的には、500 μ Mの基質（ただし、Aviptadil、Pramlintide、GLP-1、Teduglutide、Elcatoninについては例外的に125 μ Mの基質を用いた。）を、先に最適化された標準条件で、100 μ MのLimF及び2 mM GPPの存在下で20時間反応させた。

下記表15（表15-1及び15-2として示す。）に、用いた基質、その基質の特徴、標的分子及び用途、並びにHis-プレニル化効率を示す。

[0226]

[表15-1]

Name	Sequence/Structure	Name	Sequence
Cimetidine		Aviptadil	H-His - Ser - Asp - Ala - Val - Phe - Thr - Asp - Asn - Tyr - Thr - Arg - Leu - Arg - Lys - Gln - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Tyr - Leu - Asn - Ser - Ile - Leu - Asn - OH
TRH		Pramlintide	H-Lys-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Ala- Thr-Gln-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe-Leu- Val-His-Ser-Ser-Asn-Asn-Phe-Gly- Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Thr-Asn-Val- Gly-Ser-Asn-Thr-Tyr-NH ₂
Elcatonin	Cyclo(-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Asu)- Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln- Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr- Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly- Thr-Pro-NH ₂	GLP-1	H-His - Ala - Glu - Gly - Thr - Phe - Thr - Ser - Asp - Val - Ser - Ser - Tyr - Leu - Glu - Gly - Gln - Ala - Ala - Lys - Glu - Phe - Ile - Ala - Trp - Leu - Val - Lys - Gly - Arg - NH ₂
Bremelanotide	Ac-Nle-Asp(1)-His-D-Phe-Arg-Trp- Lys(1)-OH	Teduglutide	H-His - Gly - Asp - Gly - Ser - Phe - Ser - Asp - Glu - Met - Asn - Thr - Ile - Leu - Asp - Asn - Leu - Ala - Ala - Arg - Asp - Phe - Ile - Asn - Trp - Leu - Ile - Gln - Thr - Lys - Ile - Thr - Asp - OH
ANGIOTENSIN II	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro- Phe-OH	Insulin	H-Phe - Val - Asn - Gln - His - Leu - Cys - Gly - Ser - His - Leu - Val - Glu - Ala - Leu - Tyr - Leu - Val - Cys - Gly - Glu - Arg - Gly - Phe - Phe - Tyr - Thr - Pro - Lys - Ala - OH H-Gly - Ile - Val - Glu - Gln - Cys - Cys - Thr - Ser - Ile - Cys - Ser - Leu - Tyr - Gln - Leu - Glu - Asn - Tyr - Cys - Asn - OH
Leoporelin	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Leu-Leu- Arg-Pro-NHEt		
Histrelin	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-His(1- Bn)-Leu-Arg-Pro-NHEt		
GnRH	H-Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu- Arg-Pro-Gly-NH ₂		
α-mating factor	Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro- Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-OH		
Lar-D5	tacyclo[ySLFDASGHYIANYSQ] (y: D-Tyr)		
PBm1	tacyclo[wAVSNLPPRPHTYIEC]S (w: D-Trp)		

[0227]

[表15-2]

Name	% prenylation (LC/MS)	Chemical basis	Route of administration	Molecular targets	Approved indications
Cimetidine	97%	small molecular drug	oral; intramuscular	histamine H2 receptor antagonist	heartburn and peptic ulcers
TRH	15%	Thyrotropin-releasing hormone (TRH)	N/A	TRH receptor	N/A
ANGIOTENSIN II	1%	Natural ANGIOTENSIN II	Intravenous	renin-angiotensin system	Hypotension
Bremelanotide	1%	α -MSH analog	Subcutaneous	melanocortin receptors (belong to GPCR family)	women hypoactive sexual desire
Elcatonin	5%	Calcitonin analog from eel	Intranasal; subcutaneous	Calcitonin receptor	Osteoporosis
Leuprorelin	99%	GnRH analogue	Subcutaneous; intramuscular	GnRH receptor	Prostate cancer; endometriosis; uterine fibroids; precocious puberty
Histrelin	99%	GnRH analogue	Subcutaneous; intramuscular	GnRH receptor	Prostate cancer; precocious puberty
Aviptadil	90%	vasoactive intestinal polypeptide analogue	Intracavernous	VP1 receptor	Erectile dysfunction (also reported for treating COVID-19 recently)
Pramlintide	99%	amylin analogue	Subcutaneous	Calcitonin receptor	Type 1 and type 2 diabetes
GLP-1	75%	Natural GLP-1	N/A	GLP-1 receptor	N/A
Teduglutide	50%	GLP-2 analogue	Subcutaneous	GLP-2 receptor	Short bowel syndrome
Insulin	5%	Human Insulin	Subcutaneous; oral	insulin receptor	diabetes
GnRH	99%	Human GnRH	N/A	GnRH receptor	N/A
α -mating factor	39%	cell signaling peptide for yeast	N/A	N/A	N/A
Lar-D5	89%	RaPID selection hit	N/A	receptor protein tyrosine phosphatases	N/A
PBm1	99%	RaPID selection hit	N/A	Semaphorin 4D Receptor Plexin B1	N/A

[0228] 上記表15から、全てのイミダゾール含有化合物及びHis含有化合物がLimFによるプレニル化を受けたことがわかる。興味深いことに、呼吸不全を引き起こすCOVID-19を治療するために最近承認された合成血管作動性腸管ポリペプチドであるAviptadilのN末端Hisは、LimFによって約90%の変換効率でプレニル化に成功した。また、ヒスタミンH₂受容体アンタゴニストであるシメチジン、抗癌剤であるLeuprorelin、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体を認識するHistrelin、アミリンのアナログであるPramlintide、GLP-1、GLP-2のアナログであるTeduglutide、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）、並びにRaPID（Random Peptide Integrated Discove

ry) システムを介して発見されたプレキシシンB 1ーセマフォリン4 Dの相互作用を阻害するチオエーテル環状ペプチドP B m 1、及び受容体タンパク質チロシンホスファターゼに結合するL a rーD 5において、非常に高い効率でH i s残基又はイミダゾールのC 2炭素がプレニル化を受けた。特に、シメチジンがL i m Fによるプレニル化を受けたことは、4位及び5位に置換基を有するイミダゾール環をL i m Fが許容し、プレニル化を実施できることを示唆している。

以上のことから、L i m F及びそれと相同性を有する酵素が低分子化合物、ペプチド、及びタンパク質を含む多様な化合物におけるH i sの化学選択的かつ位置特異的なプレニル化を行うための生体触媒として非常に有望であることが分かった。

[0229] さらに、二種類の高分子量のタンパク質（アセチル化されたウシ由来アルブミン（A cーB S A（和光純薬））及びウマ由来のグルタチオンーSートランスフェラーゼ（G S T（シグマアルドリッチジャパン）））についてもL i m FによるH i sープレニル化を実施した。具体的には、100 μ MのA cーB S Aあるいは100 μ MのG S Tを、先に最適化された標準条件で、100 μ MのL i m F及び2 mM G P Pの存在下で20時間反応させた。反応後の反応溶液を固相抽出（S P EーCーT I P（日京テクノス社））により脱塩した後に、シナピン酸をマトリックスとして用いて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化ー飛行時間型質量分析計（M A L D IーT O FーM S、ブルカーダルトニクス社製 u l t r a f l e X t r e m e）で解析した。得られた質量スペクトルを図13に示す。

[0230] 図13から、A cーB S AがL i m Fによるプレニル化を2箇所を受けたことがわかる。また、G S TはL i m Fによって、1箇所のプレニル化を受けた。以上のことから、L i m F及びそれと相同性を有する酵素が、高分子量のタンパク質のプレニル化修飾を行うための生体触媒としても非常に有望であることが分かった。

[0231] さらに、生理活性ペプチドホルモンとして知られている種々のペプチド、

及びR a P I Dシステムを介して発見された人工環状ペプチド薬剤について、L i m F - H 1 7 2 L 変異体によるT y r - プレニル化を実施した。具体的には、500 μ Mの基質を、先に最適化された標準条件で、40 μ MのL i m F - H 1 7 2 L 及び2 mM G P P の存在下で20時間反応させた。

下記表16（表16-1及び16-2として示す。）に、用いた基質、その基質の特徴、標的分子及び用途、並びにT y r - プレニル化効率を示す。

[0232] [表16-1]

Name	Sequence	Name	Sequence
PBm1	tecyclo[wAVSNLPPRPHITYIEC]Sw: D-Trp	Leu-Enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
aMD5	tecyclo[yWYYAWDQTYKAFPC]Gy: D-Tyr	ANGIOTENSIN II	H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH
Guanylin	Pro-Gly-Thr-Cys-Glu-Ile-Cys-Ala-Tyr-Ala-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys (Disulfide bond Cys4-Cys12 and Cys7-Cys15)	Gastrin-I	Pyr-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
α-mating factor	Trp-His-Trp-Leu-Gln-Leu-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Met-Tyr-OH		

[0233] [表16-2]

Name	% prenylation (LC/MS)	Chemical basis	Route of administration	Molecular targets	Approved indications
PBm1	5%	R a P I Dシステムを介して発見された、プレキシシンB1-セマフォリン4Dの相互作用を阻害するチオエーテル環状ペプチド	N/A	Semaphorin 4D Receptor Plexin B1	N/A
aMD5	1%	R a P I Dシステムを介して発見された、ヒト幹細胞成長因子受容体結合性チオエーテル環状ペプチド	N/A	Hepatocyte growth factor (HGF) receptor	N/A
Guanylin	1%	グアニル酸シクラーゼ受容体GC-Cのアゴニスト	N/A	guanylyl cyclase receptor GC-C	N/A
α-mating factor	4%	cell signaling peptide for yeast	N/A	N/A	N/A
Leu-Enkephalin	19%	内因性オピオイドペプチド神経伝達物質	N/A	guanylyl cyclase receptor GC-C	N/A
ANGIOTENSIN II	15%	Natural ANGIOTENSIN II	Intravenous	renin-angiotensin system	Hypotension
Gastrin-I	25%	peptide hormone	N/A	cholecystokinin B receptors	N/A

[0234] 上記表16から、全てのT y r 含有化合物がL i m F - H 1 7 2 L 変異体によるT y r - プレニル化を受けたことがわかる。特に、内因性オピオイド

ペプチド神経伝達物質である Leu-Enkephalin 、アンジオテンシンⅠ、及びガストリンⅠにおいて、 Tyr 残基が高効率でプレニル化を受けた。

以上のことから、 LimF 及びそれと相同性を有する酵素が多様な化合物における Tyr の化学選択的かつ位置特異的なプレニル化を行うための生体触媒としても非常に有望であることが分かった。

[0235] [8. GLP-1 におけるプレニル基の導入]

(8. 1. プレニル基の導入)

次に、糖尿病治療薬のモチーフとして知られている GLP-1 及びその誘導体について、ラージスケールのプレニル化を行った。 GLP-1 そのものは血中安定性が低いために糖尿病治療薬としての利用が困難であるものの、脂肪酸官能基で修飾することで血中安定性が向上することが知られている。既に糖尿病治療薬として利用されている脂肪酸修飾型の GLP-1 誘導体が知られている。 GLP-1 は受容体への結合を介して細胞内の cAMP 生産を活性化する化合物である。

[0236] 下流の各種アッセイを行うのに十分な量のプレニル化 GLP-1 誘導体を得るために、 3 mL スケールでプレニル化反応を行った (25°C で 72 時間)。基質としては、以下の2つの化合物を用いた。以下の表中、「 GLP-1 」は GLP-1 の1番目の His から6番目の Arg までの部分を除いた部分であり、「 GLP-1_H7F/K34H 」は、さらに7番目の His を Phe に、 34 番目の Lys を His に置換したものである。

[0237] [表17]

GLP-1	$\text{HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR}$
	(配列番号197)

GLP-1_H7F/K34H	$\text{FAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL VHGR}$
	(配列番号204)

[0238] 反応溶液は、 LimF ($50\ \mu\text{M}$)、 GLP-1 又は GLP-1_H7F/K34H (1 mM)、 GPP (2.5 mM)、 HEPES (50 mM 、 $\text{pH } 7.2$)、 MgCl_2 (50 mM)、 1 mM DTT 、及び DMSO (

4%、v/v)を含むように調製した。反応終了後、反応混合物を合わせ、メタノール (MeOH) 2 mL と混合した。氷上で30分間インキュベートした後、遠心分離 (15300×g、10分間) により上清を分離し、9倍量の0.1% TFA-水溶液を加えて希釈した。得られた溶液を濾過し、分取逆相HPLCに供した。60分間にわたる1~60%の緩衝液Bの直線勾配を分離に使用した。プレニル化GLP-1を含有する画分を合わせ、凍結乾燥した。同様に、プレニル化GLP-1__H7F/K34Hを含有する画分についても、合わせて凍結乾燥した。精製したペプチドをさらなるアッセイのためにDMSOに溶解した。

[0239] 天然型のGLP-1はLimFによって効率良くプレニル化することができた。最終的に、3.2 mgのGLP-1から0.58 mgのプレニル化GLP-1を得ることに成功した。また、Hisの位置を変更したGLP-1__H7F/K34Hについても、LimFによって効率良くプレニル化することができた。最終的に、3.5 mgのGLP-1__H7F/K34Hから0.42 mgのプレニル化GLP-1__H7F/K34Hを得ることに成功した。

[0240] (8. 2. 化合物の評価)

GLP-1及びGLP-1__H7F/K34H、並びに得られたプレニル化GLP-1及びGLP-1__H7F/K34Hを用いて、血清安定性試験、DPP-4消化試験、及びcAMP生産活性化試験を行った。

[0241] 血清安定性試験は、各ペプチド (GLP-1及びGLP-1__H7F/K34H、並びにプレニル化GLP-1及びGLP-1__H7F/K34H) の50 µM溶液をヒト血清中、37℃でインキュベートすることにより行った (100 µLスケール)。様々なインキュベーション時間の後、反応系から4 µL分をサンプリングし、等量 (4 µL) のメタノールと混合することで反応を停止した。13000 rpmの遠心を5分間行った後の上清を回収し、4倍量の1% TFA-水溶液を加えた後でさらに5分間遠心を行った。得られた上清のうち1 µLをLC/MSで測定し、残存している各ペプチ

ドの量を定量した。

[0242] DPP-4 消化試験は、各ペプチド（GLP-1 及び GLP-1__H7F/K34H、並びにプレニル化 GLP-1 及び GLP-1__H7F/K34H）の $50\mu\text{M}$ Tris-Cl 溶液（pH 8.0）を、 $2.5\text{ng}/\mu\text{L}$ の DPP-4 の存在下、 37°C でインキュベートすることにより行った（ $100\mu\text{L}$ スケール）。様々なインキュベーション時間の後、反応系から $4\mu\text{L}$ 分をサンプリングし、4 倍量（ $16\mu\text{L}$ ）の 1% TFA-水溶液の添加により反応を停止した。 13000rpm の遠心を 5 分間行った後の上清のうち $1\mu\text{L}$ を LC/MS で測定し、残存している各ペプチドの量を定量した。

[0243] cAMP 生産活性化試験は、各ペプチド（GLP-1 及び GLP-1__H7F/K34H、並びにプレニル化 GLP-1 及び GLP-1__H7F/K34H）について、DiscoverX（米国カリフォルニア州フレモント）から購入した cAMP HunterTM eXpress GLP1R CHO-K1 GPCR アッセイキットを用いて製造業者のプロトコルに従って測定した。用いたペプチドの濃度範囲は、 0.33pM ~ 20nM である。

[0244] 各試験の結果を図 15 に示す。

図 15（a）（b）に示すように、未修飾の GLP-1 及び GLP-1__H7F/K34H は速やかな分解を示したが、それぞれのプレニル化体はより高い安定性を示した。

また、図 15（c）に示すように、天然型の GLP-1 は強く cAMP 生産を活性化したが、その His7 をプレニル化したペプチドについては、cAMP 生産活性化能が大きく低下した。これは、GLP-1 が受容体に結合する際に His7 が重要であることが知られていることと合致する。また、His の位置を置き換えた GLP-1__H7F/K34H は、天然型の GLP-1 と遜色ない活性を維持していることが分かった。さらに、GLP-1__H7F/K34H のプレニル化体についても、同じく高い cAMP 生産活

性化能が確認された。

[0245] 以上のことから、上記の方法で製造したプレニル化GLP-1__H7F/K34Hは、天然型のGLP-1よりも高い血中安定性を有し、天然型のGLP-1と同等の受容体活性化能を有することが示唆された。

[0246] [9. LimFの変異体のさらなる検討]

(9. 1. LimFの変異による基質許容性の変化)

LimFに変異を導入することにより、図7に示したLimFの基質許容性を変化させることを試みた。基質としては、図7(b)に示す、Hisの-1位に変異を導入したteLimE2を用いた。

転写共役 *in vitro* 翻訳系 (transcription-coupled *in vitro* translation system) は、以下の成分を含む構成とした：500 μ Mの各タンパク質性アミノ酸（メチオニンを除く）、50 mMのHEPES-KOH（pH 7.6）、12 mMのMg(OAc)₂、100 mMの酢酸カリウム、2 mMのspermidine、1 mMのDTT、20 mMのクレアチンリン酸（ロッシュ社）、2 mMのATP、2 mMのGTP、1 mMのCTP、1 mMのUTP、0.1 mMの10-ホルミル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロ葉酸、1.5 mg/mlの大腸菌の全tRNA（ロッシュ社）、0.73 μ MのAlaRS、0.03 μ MのArgRS、0.38 μ MのAsnRS、0.13 μ MのAspRS、0.02 μ MのCysRS、0.06 μ MのGlnRS、0.23 μ MのGluRS、0.09 μ MのGlyRS、0.02 μ MのHisRS、0.4 μ MのIleRS、0.04 μ MのLeuRS、0.11 μ MのLysRS、0.03 μ MのMetRS、0.68 μ MのPheRS、0.16 μ MのProRS、0.04 μ MのSerRS、0.09 μ MのThrRS、0.03 μ MのTrpRS、0.02 μ MのTyrRS、0.02 μ MのValRS、0.6 μ MのMTF、2.7 μ MのIF1、0.4 μ MのIF2、1.5 μ MのIF3、0.26 μ MのEF-G、10 μ MのEF-Tu、0.66 μ MのEF-Ts、0.25 μ MのRF2、0.17 μ MのRF3、0.5 μ MのRRF、0.1 μ MのT7 R

NAポリメラーゼ、0.1 μ Mのヌクレオチドニリン酸キナーゼ、4 μ g/
mlのクレアチンキナーゼ、3 μ g/mlのミオキナーゼ、0.1 μ Mのピ
ロホスファターゼ、1.2 μ Mのリボソーム、0.04 μ M mDNA鋳型
。

[0247] 上記の組成物に、DNA鋳型、及び^{C I A c D}P h eがチャージされたtRNA^{fMet_{CAU}}を、それぞれ0.04 μ M及び50 μ Mの最終濃度で添加した。次いで、混合物を37℃で1時間インキュベートして、翻訳及び自発的チオエーテル環形成を促進した。

[0248] 1時間の翻訳後、3 μ Lの翻訳混合物を2 μ Lの酵素/GPP混合溶液と個別に混合し、20～100 μ MのL i m F又は変異体、及び1 mMのGPPを含む反応混合物を形成した。L i m Fの基質許容性を調べるためのi n v i t r o翻訳されたt e M Pとの反応については、10 μ M L i m Fを除いて、同一の条件を用いた。25℃で16時間インキュベートした後、45 μ Lの1% TFA水溶液を添加することにより反応を停止した。次いで、混合物を10分間氷上でインキュベートし、4℃での遠心分離（15300×g、10分間）により沈殿物を分離し、上清10 μ LをLC-MS分析に供した。

[0249] L i m Fの変異の導入部位については、結晶構造において基質の-1位側鎖を格納する小さなポケットを形成しているアミノ酸を選択した。具体的には、52番目のI l e及び72番目のG l nを選択し、これらをA l aに置換した変異体をそれぞれ調製した。野生型のL i m F及び各変異体について、-1位のアミノ酸とプレニル化効率の関係を図16に示す。図16から、特にI52A変異体において、L e uやP h eのようなかさ高いアミノ酸が-1位に存在する基質でも効率よくプレニル化できることがわかった。

[0250] (9.2. L i m Fの変異によるプレニル基ドナー許容性の変化)

L i m Fに変異を導入することにより、「2. L i m Fの酵素活性評価」で調べたL i m Fのプレニル基ドナーに対する選択性を変化させることを試みた。基質としては、図7(a)に示す、t e L i m E 2を用いた。

L i m F 変異体のアッセイのために、100 μ M の b c L i m E 2 を、1 mM の G P P 又は D M A P P、50 mM の H E P E S (pH 7.2)、40 mM の M g C l₂、1 mM の D T T、D M S O (4%、v/v) の条件下で、20~100 μ M の L i m F 変異体と個別に5 μ L スケールでインキュベートした。25℃で16時間インキュベートした後、9倍量(45 μ L)の1% T F A 水溶液を添加することにより反応を停止した。次いで、混合物を、10分間氷上でインキュベートし、4℃での遠心分離(15300×g、10分間)により沈殿物を分離し、上清1 μ L を L C - M S 分析に供した。

[0251] L i m F の変異の導入部位については、結晶構造においてプレニル基を格納するポケットを形成しているアミノ酸を選択した。具体的には、224番目のG l y を選択し、これをより大きなアミノ酸へと置換した。なお、図17に示すように、複数のプレニル基転移酵素をアライメントしたところ、C10プレニル基(ゲラニル基)転移酵素は、L i m F の224番目に対応する位置に特徴的なG l y を有することがわかった。この配列アライメントは、224番目のG l y がプレニル基選択性に寄与するとの仮説を支持した。

[0252] 各変異体について、プレニル基ドナーとプレニル化効率の関係を図18に示す。図18から、特にG224M変異体において、C5プレニル化(ジメチルアリル化)が選択的に生じることがわかった。

[0253] 同様に、C15プレニル化(ファルネシル化)に対して高い選択性を有するL i m F 変異体も調査した。

L i m F 変異体のアッセイのために、100 μ M の b c L i m E 2 を、1 mM の G P P 又は F P P、50 mM の H E P E S (pH 7.2)、5 mM の M g C l₂、1 mM の D T T、D M S O (4%、v/v) の条件下で、20~100 μ M の L i m F 変異体と個別に5 μ L スケールでインキュベートした。25℃で16時間インキュベートした後、9倍量(45 μ L)の1% T F A 水溶液を添加することにより反応を停止した。次いで、混合物を、10分間氷上でインキュベートし、4℃での遠心分離(15300×g、10

分間)により沈殿物を分離し、上清 1 μ L を LC-MS 分析に供した。

[0254] LimF の変異の導入部位については、結晶構造においてプレニル基を格納するポケットを形成しているアミノ酸を選択した。具体的には、図 19 の左列の表に記載の位置のアミノ酸を比較的小さな Ala に置換した。その結果、273 番目の Trp を置換した場合に、ファルネシル化活性が上昇した (19% ; 図 19)。

[0255] そこで、W273 位置について、Ala 以外のアミノ酸への置換を網羅的に試した (図 19 の中列)。その結果、W273N 変異と W273T 変異に着目し、W273N 変異と W273T 変異に加えて、273 位に隣接するアミノ酸である 239 番目の His についても様々なアミノ酸への同時置換を試した (図 19 の右列)。その結果、H239G/W237T 変異体、及び H239G/W237N 変異体において、C15 プレニル化 (ファルネシル化) が高い選択性で高効率に生じることがわかった。

以上により、より幅広いプレニル基骨格を有するペプチドの生産が確認された。

[0256] 次に、野生型の LimF の C10 プレニル化、G224M 変異体の C5 プレニル化、及び H239G/W237T 変異体の C15 プレニル化に関して、速度論パラメータを測定した。

具体的には、10 μ M LimF 又は LimF 変異体、1 mM GPP、DMAPP、FPP、又は GGPP、50 mM HEPES (pH 7.2)、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、DMSO (4%、v/v)、及び様々な濃度の bcLimE2 で、25°C で修飾反応を実施した。初期速度及び基質濃度を Graphpad Prism 8.4.2 ソフトウェアの Michaelis-Menten モデルにフィッティングさせて、速度論パラメータを推定した。

また、プレニル基ドナーの濃度依存性を試験するために、1 μ M の LimF 又は LimF 変異体、1 mM 又は様々な濃度の GPP、DMAPP、FPP、又は GGPP、50 mM の HEPES (pH 7.2)、0.1 mM の

b c L i m E 2、1 mMのD T T、及び5 mMのM g C l₂で、修飾反応を実施した。プレニル基ドナーなしで25℃に予熱した後、プレニル基ドナーの添加によって反応を開始した。25℃でインキュベートした後、各時点で反応を停止し、L C - M Sで分析した。次に、線形領域の傾きとして初期速度を計算した。各実験を3回繰り返した。プレニル基ドナーの濃度依存性について、初期速度をG r a p h p a d P r i s m 8.4.2ソフトウェアにおける非線形回帰分析を用いてM i c h a e l i s - M e n t e n モデルにフィッティングさせた。結果を以下の表に示す。表18中、「n.r.」は反応が進行しなかったことを表す。

[0257] [表18]

酵素	プレニル基ドナー	最終変換効率	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ mM ⁻¹)
wt-LimF	DMAPP	n.r.	-	-	-
	GPP	>99%	0.31 ± 0.04	13.8 ± 0.6	44.1
	FPP	0.0027%	-	-	-
	GGPP	n.r.	-	-	-
LimF-G224M	DMAPP	>99%	-	Not tested	
	GPP	n.r.	-	-	-
	FPP	n.r.	-	-	-
	GGPP	n.r.	-	-	-
LimF-H239G/W273T	DMAPP	n.r.	-	-	-
	GPP	16.9%	0.58 ± 0.07	0.022 ± 0.001	0.04
	FPP	>99%	0.62 ± 0.06	0.63 ± 0.03	1.02
	GGPP	n.r.	-	-	-

[表19]

LimF-H239G/W273T	$K_{FPP} = 0.014 \pm 0.001$ mM $V_{max} = 0.849 \pm 0.014$ min ⁻¹
wt-LimF	$K_{GPP} = 0.11 \pm 0.014$ mM $V_{max} = 10.03 \pm 0.24$ min ⁻¹

[0258] 次に、H 2 3 9 G / W 2 3 7 T 変異体についても、L i m Fと同様に高い基質許容性を有することを確認した。基質としては、3種類の非天然基質（シメチジン、G L P - 1、及びG L P - 1 _ H 7 F / K 3 4 H）を用いた。

具体的には、シメチジン、G L P - 1、又はG L P - 1 _ H 7 F / K 3 4

Hのファルネシル化のために、各化合物0.2 mMを、先に最適化された標準条件下で、50 μ M LimF-H239G/W273T変異体、及び1 mM FPPと20時間インキュベートした。

[0259] 各化合物における、ファルネシル化効率を図20に示す。H239G/W273T変異体を用いることで、非天然基質のファルネシル化を達成できることが確認された。

[0260] 最後に、G224M変異体のC5プレニル化、及びH239G/W237T変異体のC15プレニル化に関して、プレニル化の位置選択性が野生型のLimFと変わっていないことを確認した。[2. LimFの酵素活性評価]に記載した方法と同様のMS/MS分析により、野生型のLimFがHis側鎖のイミダゾール環上のC2炭素をゲラニル化すると同様に、G224M変異体、及びH239G/W237T変異体も、イミダゾールC2炭素を、それぞれジメチルアリル化、及びファルネシル化することが確認された。

[0261] [10. 付記]

Hisは芳香族側鎖を有する4つのタンパク質性アミノ酸のうちの1つであり、金属結合、水素結合、プロトン輸送、及び求核剤等のタンパク質/ペプチド機能に不可欠な役割を果たす、電子不足のヘテロ芳香族イミダゾール側鎖を特徴とする (Liao, S.-M., Du, Q.-S., Meng, J.-Z., Pang, Z.-W. & Huang, The multiple roles of histidine in protein interactions. Chem. Cent. J., 7, 1-12 (2013).)。しかし、Hisの修飾が起こることは稀である。その中でも、酵素的及び化学的アプローチの両方において、N-リン酸化及びアルキル化のような、求核性ヘテロ原子の修飾が多い (Jia, S., He, D. & Chang, C.J. Bioinspired Thiophosphorodichloridate Reagents for Chemoselective Histidine Bioconjugation. Journal of the American Chemical Society 141, 7294-7301 (2019).; Kee, J.-M. & Muir, T.W. Chasing Phosphohistidine, an Elusive Sibling in the Phosphoamino Acid Family. ACS Chem. Biol. 7, 44-51 (2012).)。

[0262] 一連の芳香族 P T a s e は、芳香族化合物、主に低分子化合物に対して多様なプレニル化反応を行うことが特徴であるが、ペプチド上の芳香族残基のプレニル化は、それぞれ T r p 及び T y r 残基のインドール及びフェノール基に限定されている。イミダゾール環上の炭素原子は電子不足であり、官能化が困難であるため、プレニル化イミダゾール構造を有する低分子天然物はほとんどなかった (Larsen, T.O., Frisvad, J.C. & Jensen, Aurantiamine, a diketopiperazine from two varieties of *Penicillium aurantiogriseum*. *Phytochemistry*, 31, 1613-1615 (1992).; Kanoh, K. et al. (-)-Phenylahistin: a new mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7, 2847-2852 (1997).)。

[0263] イミダゾールの最も電子不足の C - 2 が修飾された天然物はさらに稀であり、これまでに C - 2 ジメチルアリル化イミダゾール構造を有する化合物は、1つしか見出されていない (Jan, C., Dippenaar, A. & Holzapfel, Crystalline structure of the metal complexes of viridamine. *S. Afr. J. Chem.*, 30, 161-168 (1977).)。

これまでのところ、H i s の C - アルキル化を触媒する酵素は、自然界ではそのような構造が稀であるために未開拓のままであった。我々の知る限りでは、L i m F は H i s の C - 2 アルキル化を触媒する最初の構造解析された P T a s e である。

[0264] L i m F は、H i s のプレニル化活性のほかに、T y r のプレニル化の機能も示した。ほとんどのシアノバクチン P T a s e において、多様な配列が許容されるものの、修飾される部位には選択性がある。L i m F の様に、シアノバクチン P T a s e が2つの異なるアミノ酸の C - 及び O - プレニル化を触媒するのは前例のないことである。

[0265] 他方、ペプチドベースの分子は、特に、細胞内の目的タンパク質 (P O I) を標的とする能力のために、有望な治療方法となっている。

ペプチドリガンドの発見に関しては、チオエーテル環状ペプチドライブラリーを用いた十分に確立された R a P I D システムが、ほとんどのタイプの

P O I に対する新規スクリーニングペプチドリガンドに対する強力なワークフローとして証明されている (Taguchi, S. & Suga, Targeting of extracellular protein-protein interactions with macrocyclic peptides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 62, 82-89 (2021).; Peacock, H. & Suga, Discovery of De Novo Macrocyclic Peptides by Messenger RNA Display. *Trends Pharmacol. Sci.*, 42, 385-397 (2021).)。

L i m F がこのような非天然の大環状骨格をプレニル化できることが証明されたことを考えると、L i m F 統合 R a P I D システムによって、膜透過性が向上した所望の P O I を標的とする多様なプレニル化ペプチドリガンドの同定を達成することができるであろう。

[0266] さらに、L i m F の発見はペプチド修飾法の拡大にも寄与すると考えられる。これまでに報告されたペプチド修飾法については、かなりの進歩があったにもかかわらず、これらは C y s や L y s のような求核性残基に大きく依存している。

ラジカル媒介アプローチにより媒介される H i s C - 2 アルキル化が実証された最近の報告は 2 件あるが、H i s の直接的後期官能化はペプチド上の種々の妨害官能基の存在のためにまだ初期段階にある (Noisier, A.F. et al. Late-Stage Functionalization of Histidine in Unprotected Peptides . *Angew. Chem.*, 58, 19096-19102 (2019).; Chen, X. et al. Histidine-Specific Peptide Modification via Visible-Light-Promoted C-H Alkylation . *J. Am. Chem. Soc.* 141, 18230-18237 (2019).)。

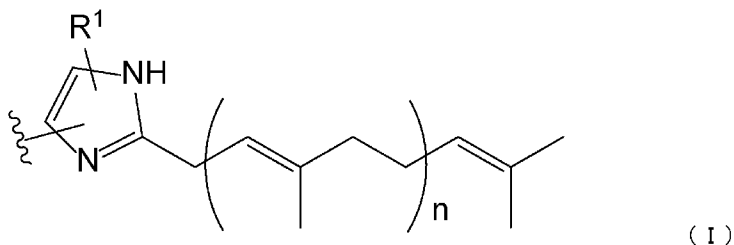
本明細書では、種々の化合物（低分子化合物、ペプチド、及びタンパク質）が L i m F によって選択的にプレニル化されることが示された。L i m F の構造解析により、プレニル化効率が低い基質に適応するように基質相互作用残基を変えるなど、L i m F の汎用性を高めた設計が可能となった。著しい化学選択性及び位置選択性、高い基質許容性、並びに穏和な反応条件のため、L i m F は、化学的に困難な位置選択的 H i s C - 2 官能化の強力な生体触媒として役立つことが期待される。

[0267] さらに、系統樹解析及びSSN解析により、LimFとは別の生物由来の11種類のタンパク質が、LimFと同様に、HisのC-プレニル化活性及び／又はTyrのO-プレニル化活性を示すことが示唆された。

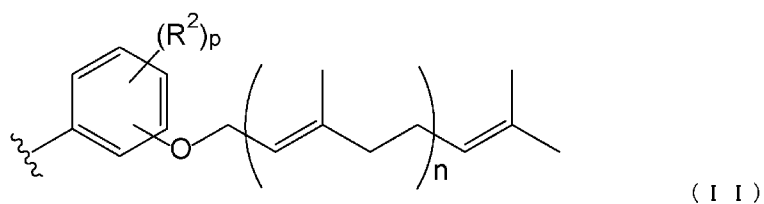
請求の範囲

[請求項1] 下記式 (I) 又は (I I) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物の製造方法であって、

[化1]



[化2]



(上記式 (I) 中、R¹は水素原子又は任意の置換基であり、nは0～11の整数を示し、

上記式 (I I) 中、R²はそれぞれ独立して、任意の置換基であり、pは0～4の整数を示し、nは0～11の整数を示す。)

下記式 (I I I) 又は (I V) で表される構造を少なくとも 1 つ有する化合物をプレニル基転移酵素に接触させて前記構造にプレニル基を導入する工程を含み、

[化3]



[化4]



(上記式 (I I I) 及び式 (I V) 中、 R^1 、 R^2 及び p は、前記と同義である。)

前記プレニル基転移酵素は、 $L i m F$ 又はそれと相同性を有する酵素である、

製造方法。

[請求項2] 少なくとも1つの $H i s$ 、 $T y r$ 、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質をプレニル基転移酵素に接触させ、少なくとも1つの $H i s$ 残基、 $T y r$ 残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する、請求項1に記載の製造方法。

[請求項3] 少なくとも1つの $H i s$ 、 $T y r$ 、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーをプレニル基転移酵素に接触させ、少なくとも1つの $H i s$ 残基、 $T y r$ 残基、又はこれらの誘導体残基にプレニル基を導入する工程を含み、

前記プレニル基転移酵素は、 $L i m F$ 又はそれと相同性を有する酵素である、

プレニル化されたペプチド又はタンパク質を含む化合物ライブラリーの製造方法。

[請求項4] $m R N A$ ライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳し、少なくとも1つの $H i s$ 、 $T y r$ 、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質を含む前記化合物ライブラリーを調製する工程を更に含む、請求項3に記載の製造方法。

[請求項5] 前記化合物ライブラリーにおける前記ペプチド又は前記タンパク質が、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質である、請求項3又は4に記載の製造方法。

[請求項6] $m R N A$ ディスプレイ法により、遺伝子型が結合したペプチド又はタンパク質を含む前記化合物ライブラリーを調製する工程を更に含み、

該工程は、

各 mRNA が少なくとも 1 つの H i s、T y r、又はこれらの誘導体を含むアミノ酸配列を有するペプチド又はタンパク質をコードする mRNA ライブラリーを準備する工程と、

前記 mRNA ライブラリーの各 mRNA の 3' 末端にピューロマイシンを結合させ、ピューロマイシン結合 mRNA ライブラリーを製造する工程と、

前記ピューロマイシン結合 mRNA ライブラリーを無細胞翻訳系によって翻訳する工程と、を含む、請求項 5 に記載の製造方法。

[請求項7] 前記プレニル基転移酵素は、*Limnothrix* sp. 若しくは *Symplocos* sp. に由来するプレニル基転移酵素、又はそれらと相同性を有する酵素を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項8] 前記プレニル基転移酵素は、以下の (1)、(2) 又は (3) に該当するアミノ酸配列を含む酵素を含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

(1) 配列番号 1 ～ 12 のいずれかで表されるアミノ酸配列

(2) 配列番号 1 ～ 12 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列

(3) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列

[請求項9] 前記プレニル基転移酵素は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列、及びこれらのアミノ酸配列において 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する酵素からなる群より選択される少なくとも 1 つである、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項10] プレニル化された化合物が、4 以上のアミノ酸により形成される環

状構造を有するペプチド又はタンパク質である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項11] 前記プレニル基転移酵素に接触される化合物がペプチド又はタンパク質であり、

該ペプチド又はタンパク質は、 $Xaa1-Xaa2$ で表される部分構造を有するか、N末端に His、Tyr、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有し、

$Xaa1$ は、中性アミノ酸であり、 $Xaa2$ は、His、Tyr、又はこれらの誘導体である、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項12] 前記プレニル基転移酵素に接触される化合物がペプチド又はタンパク質であり、

該ペプチド又はタンパク質は、 $Xaa2-Xaa3$ で表される部分構造を有するか、C末端に His、Tyr、又はこれらの誘導体を有するアミノ酸配列を有し、

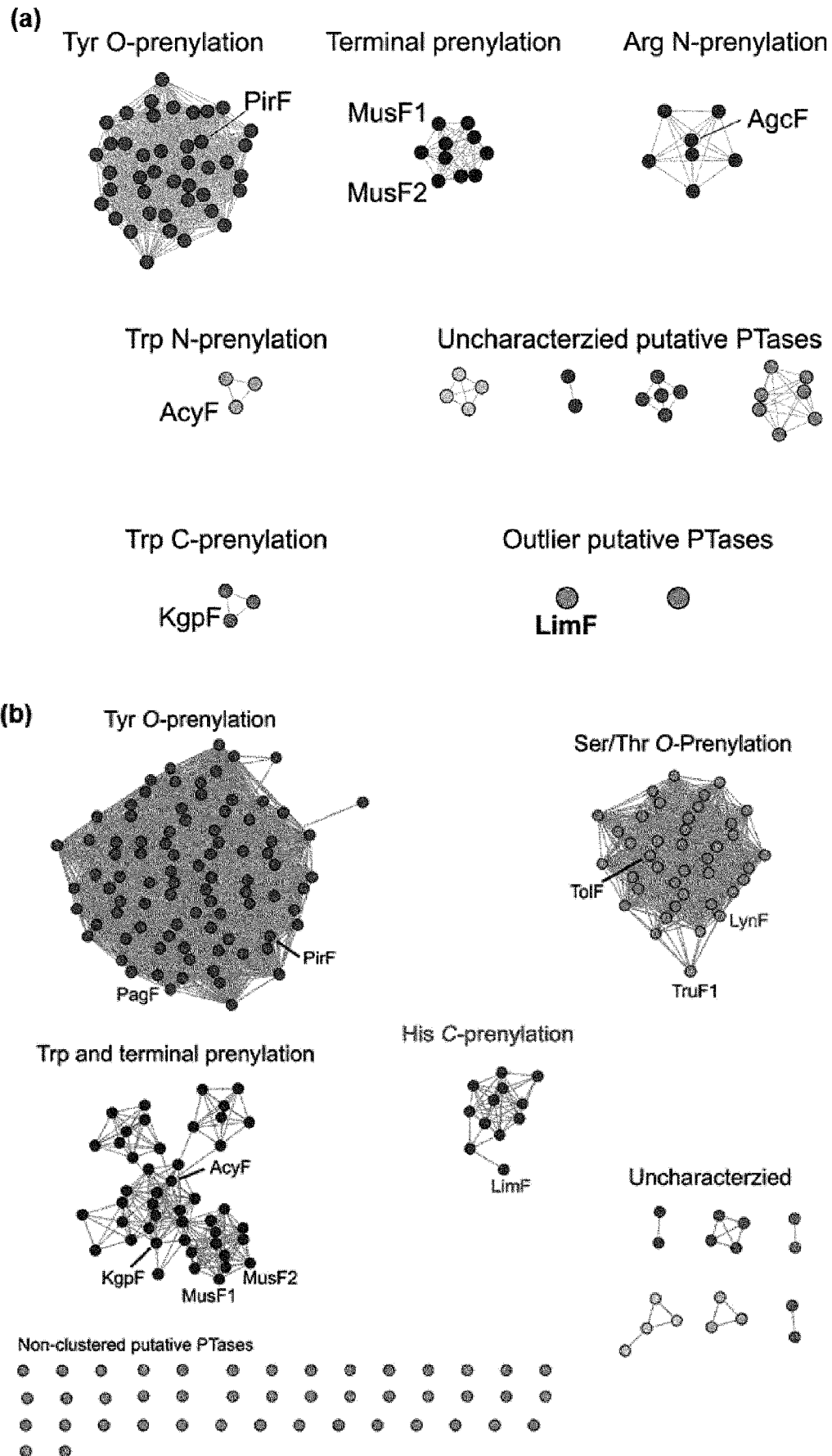
$Xaa2$ は、His、Tyr、又はこれらの誘導体であり、 $Xaa3$ は Pro 及びその誘導体以外の任意のアミノ酸である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

[請求項13] 請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造された、化合物ライブラリー。

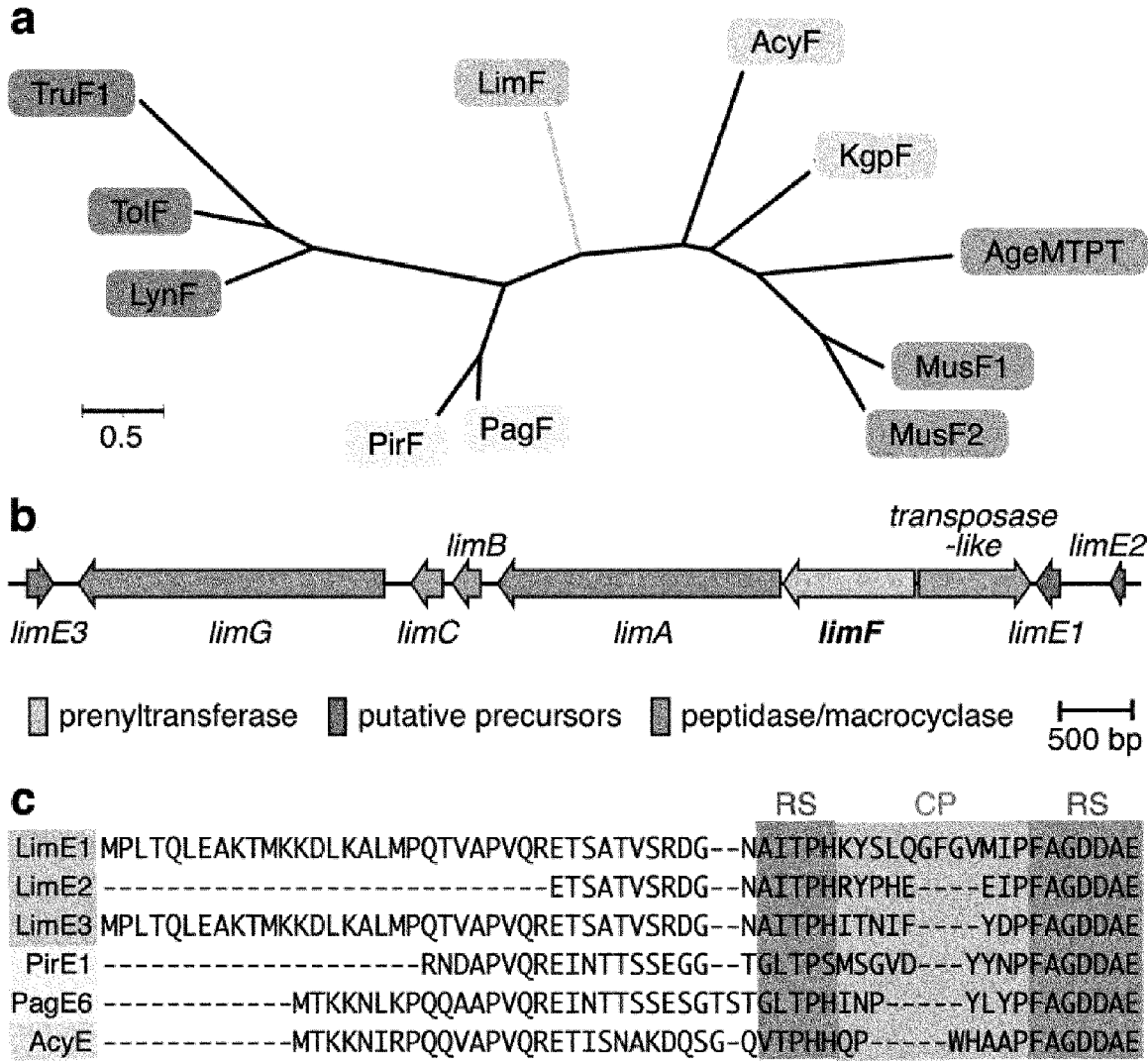
[請求項14] 請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造された化合物ライブラリーを標的物質に接触させる工程と、

前記標的物質に結合する化合物を選択する工程と、を含む、
標的物質に結合する化合物を同定するスクリーニング方法。

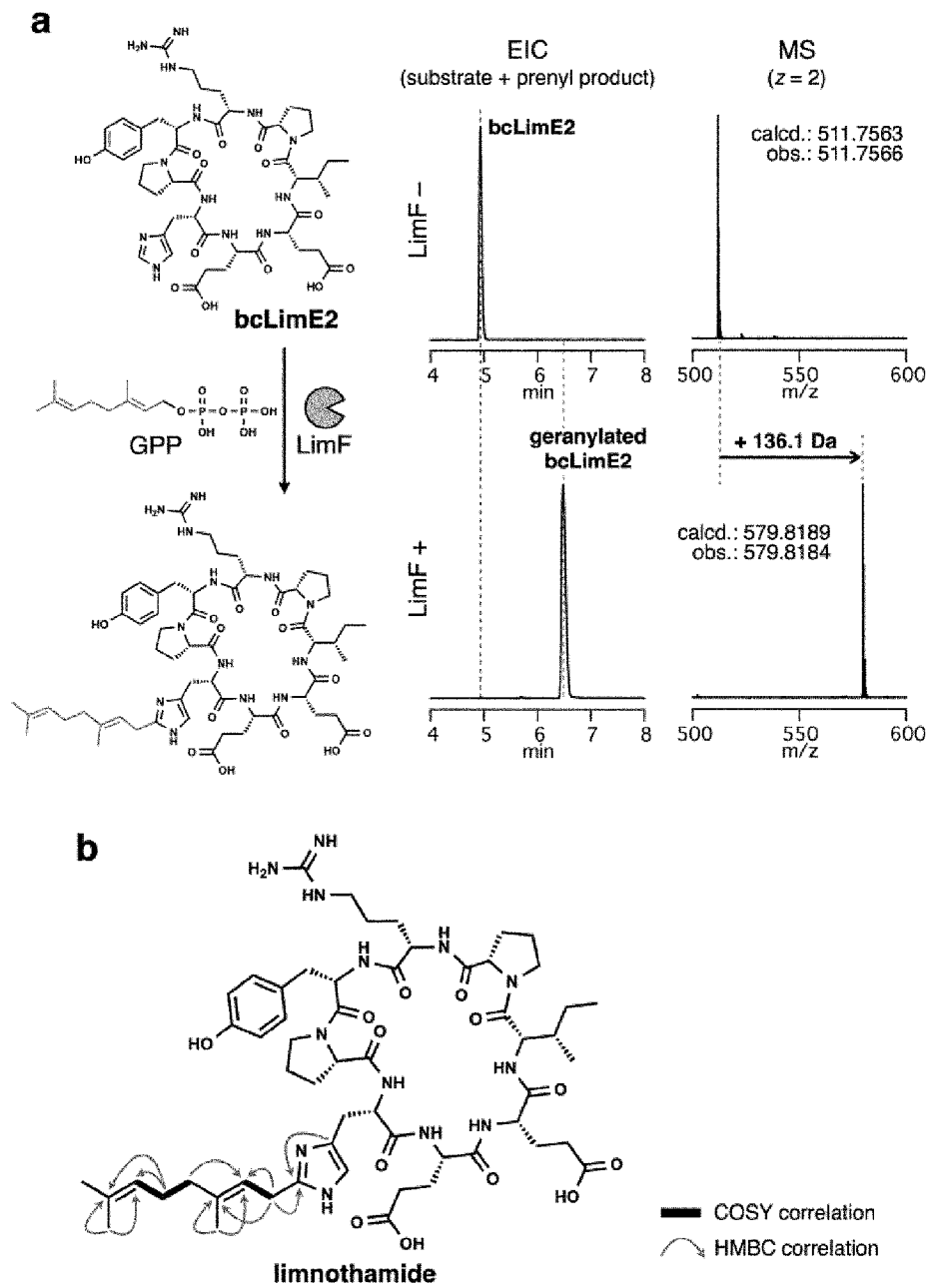
[図1]



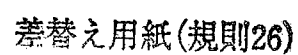
[図2]



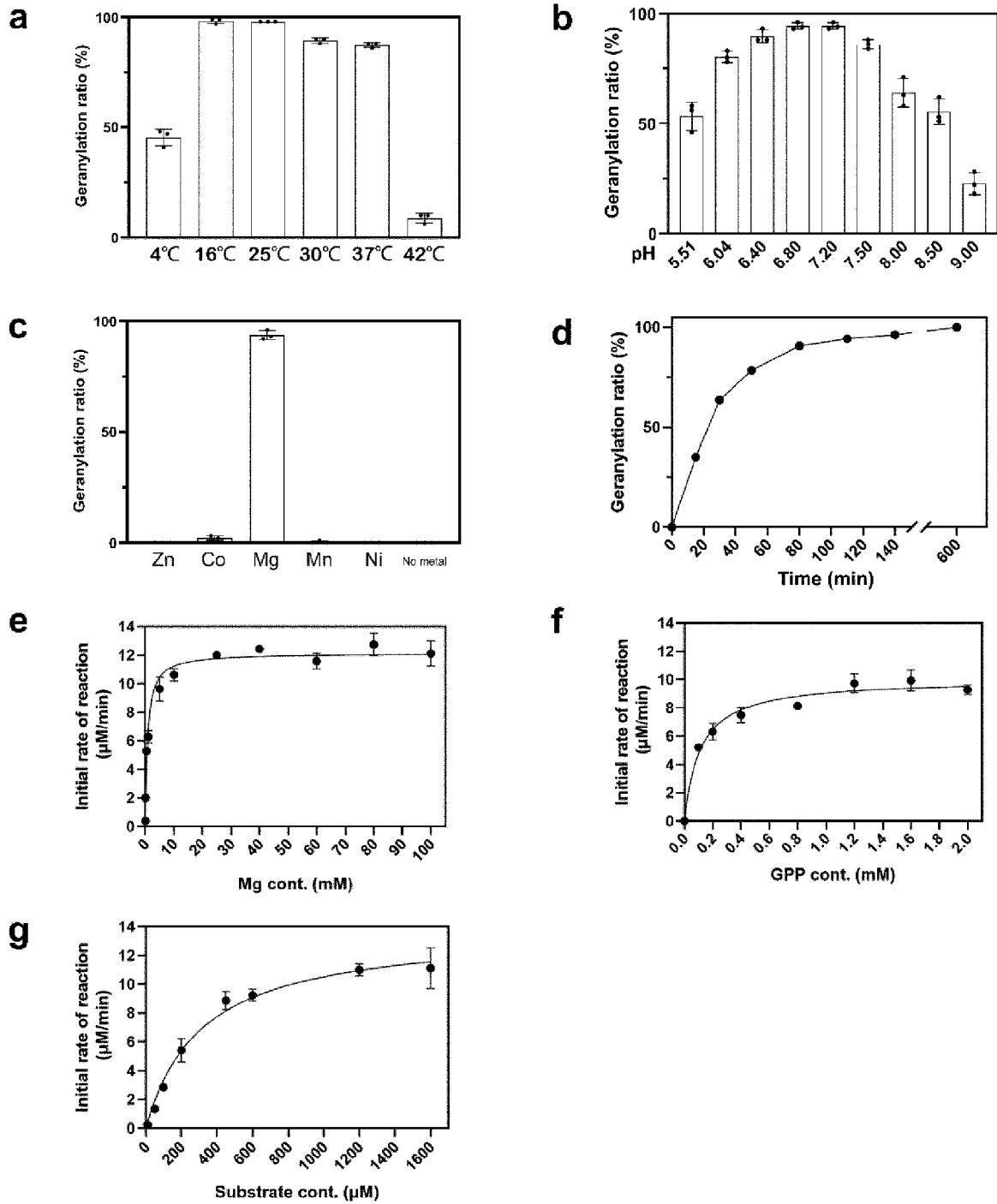
[図3]



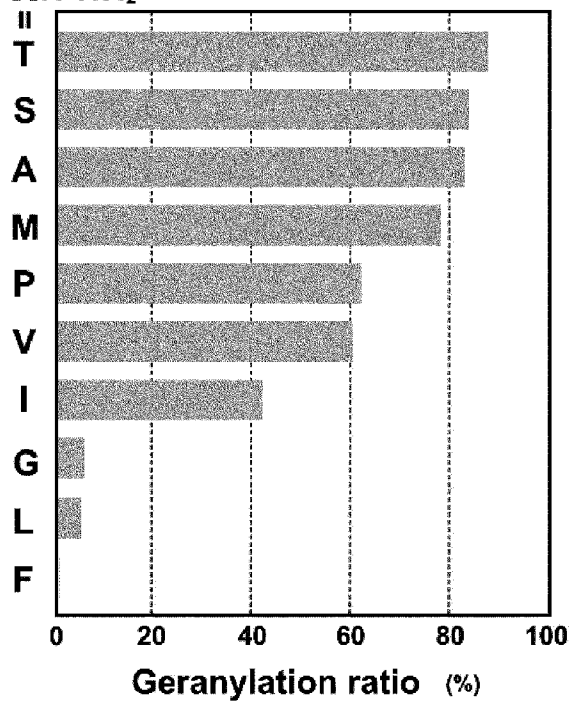
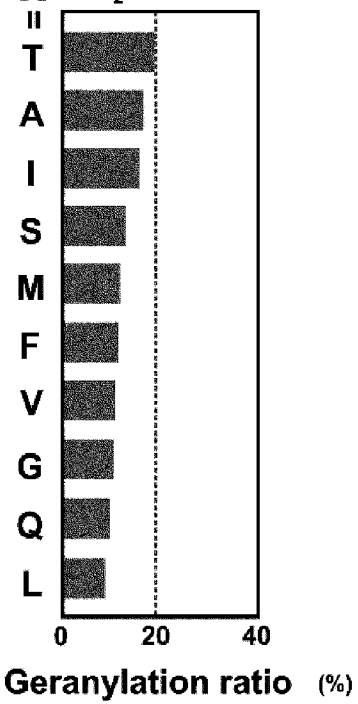
a



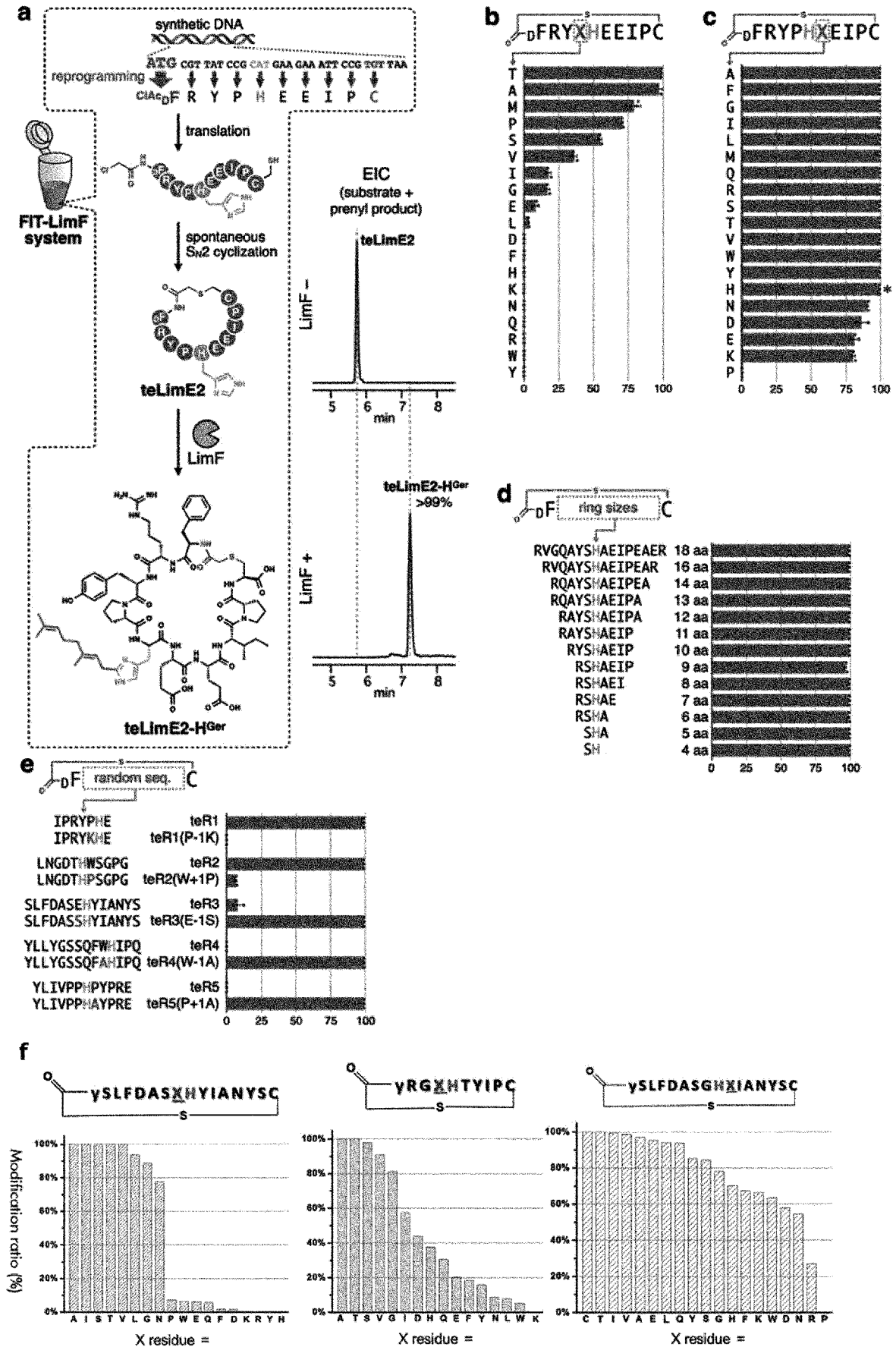
[5]



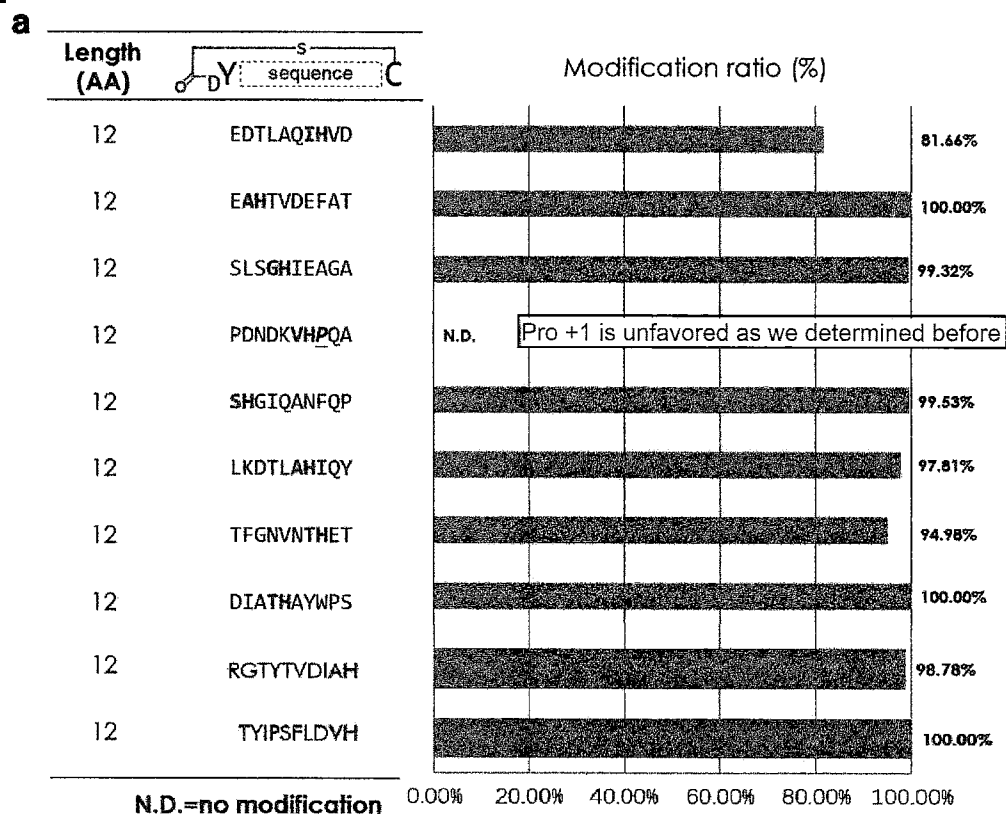
[図6]

Ac-XH-NH₂Ac-HX-NH₂

[7]

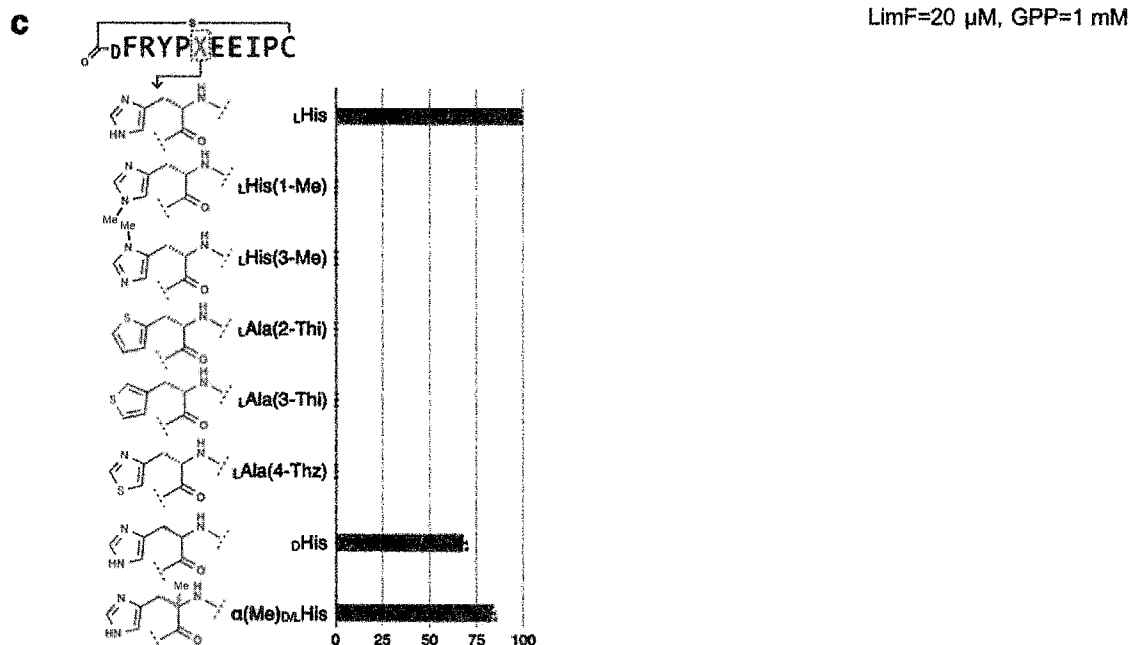


[図 8]

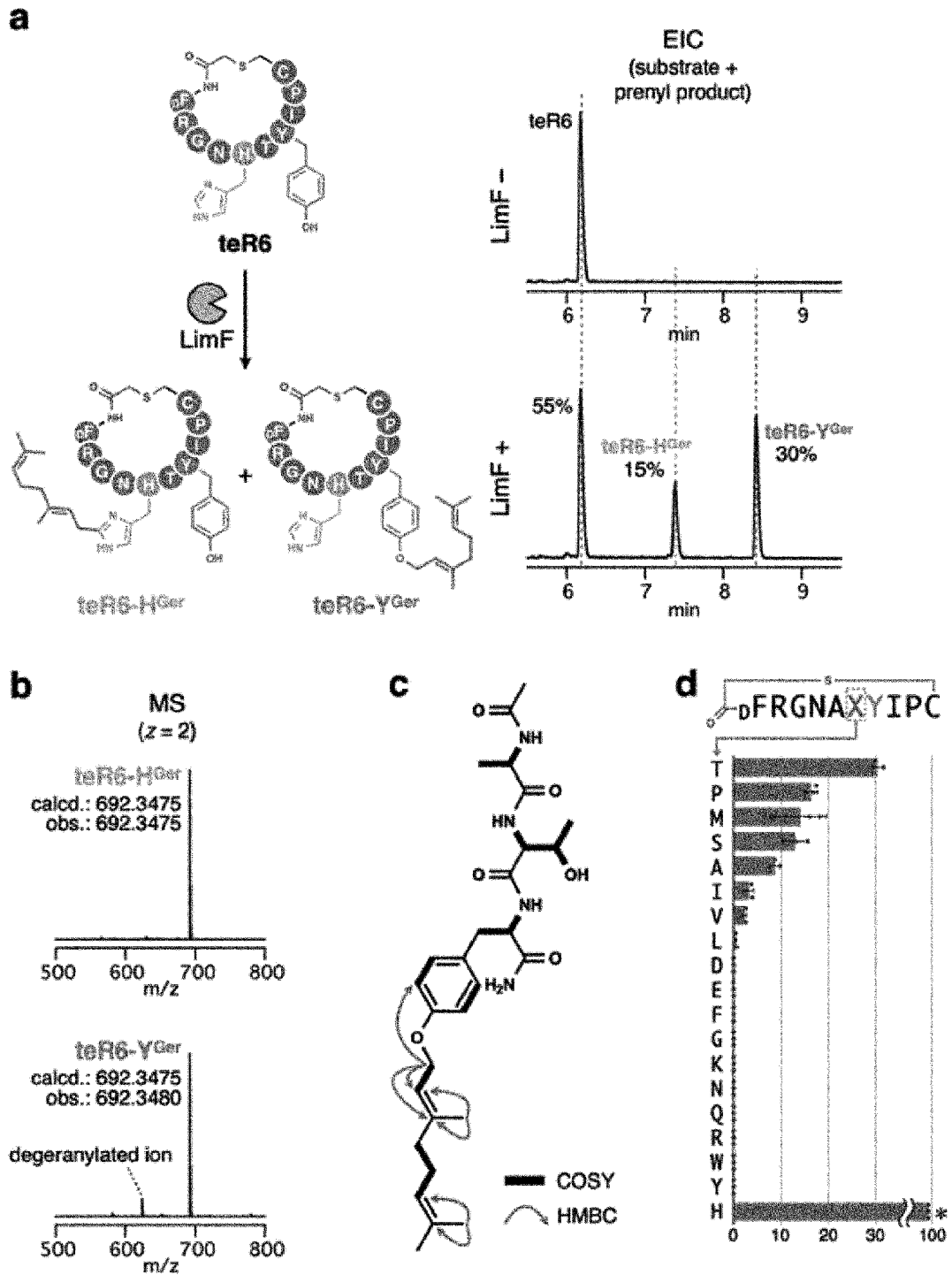


b

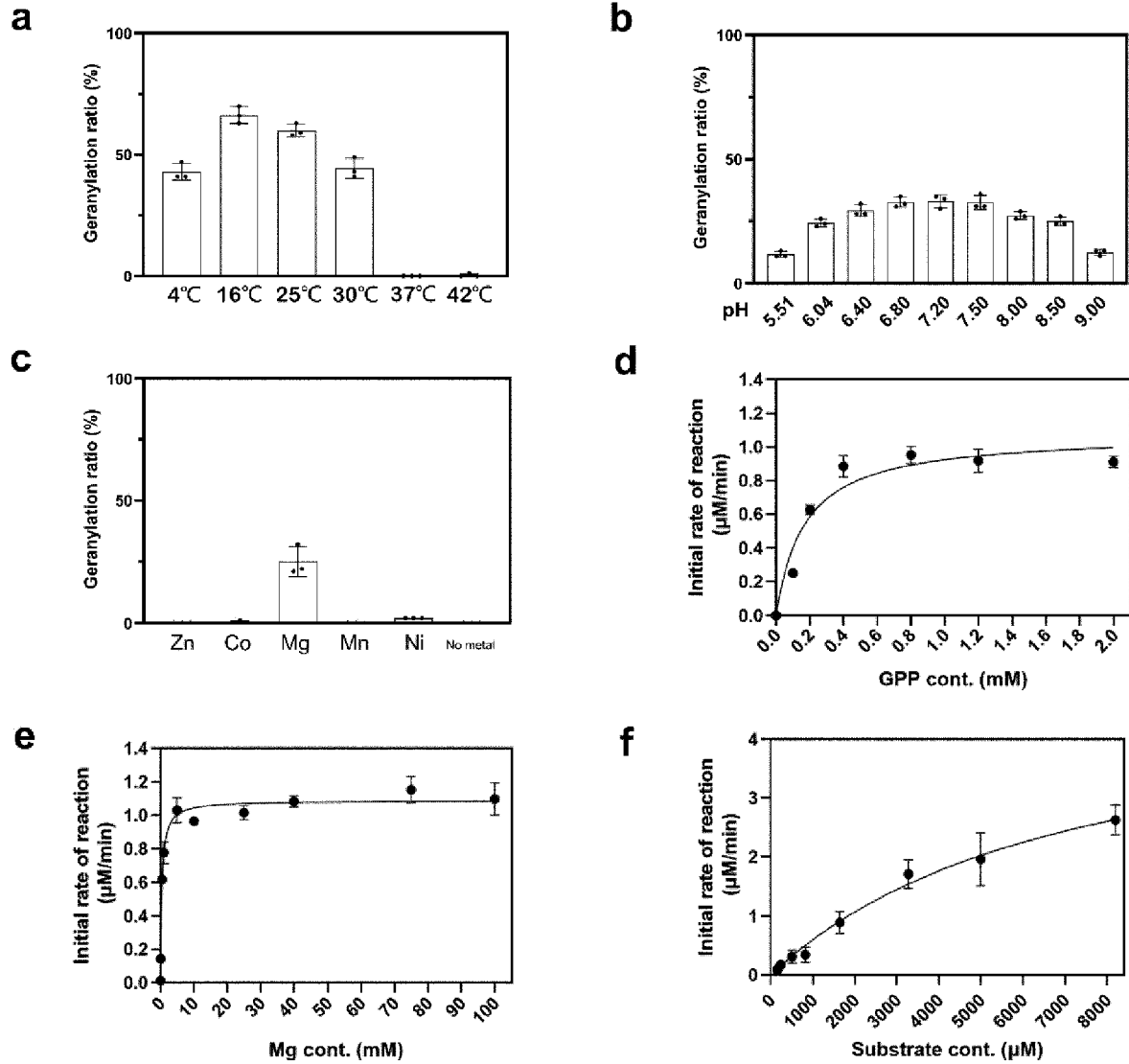
Sequence	% of modification				Number of His
	plus 0 geranyl	plus 1 geranyl	plus 2 geranyl	plus 3 geranyl	
RYPHTGHIYP	N/D	74.56%	25.44%	N/A	2
RYPHTAGHIYP	N/D	92.19%	7.81%	N/A	2
RYPHTAAGHIYP	N/D	82.56%	17.44%	N/A	2
RYPHTAGAGHIYP	N/D	78.41%	21.59%	N/A	2
RYPHTAHAGHIYP	N/D	4.43%	95.57%	N/D	3



[図9]



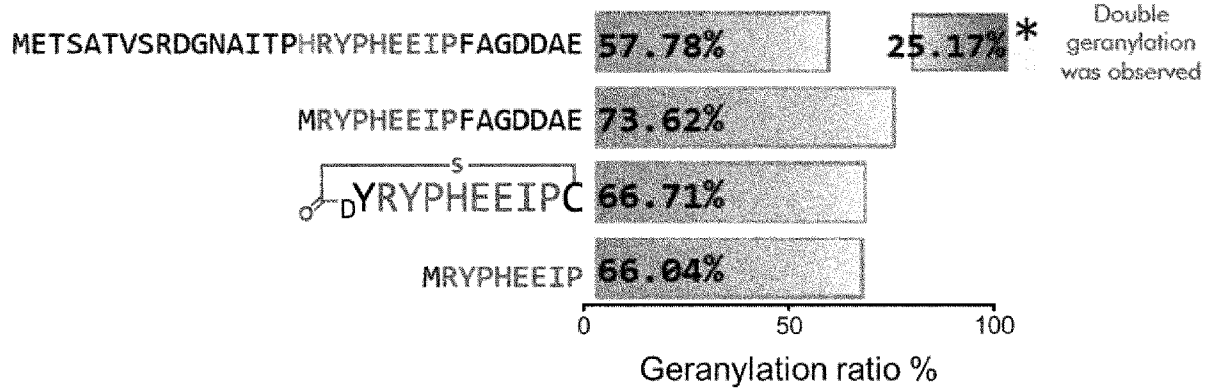
[図10]



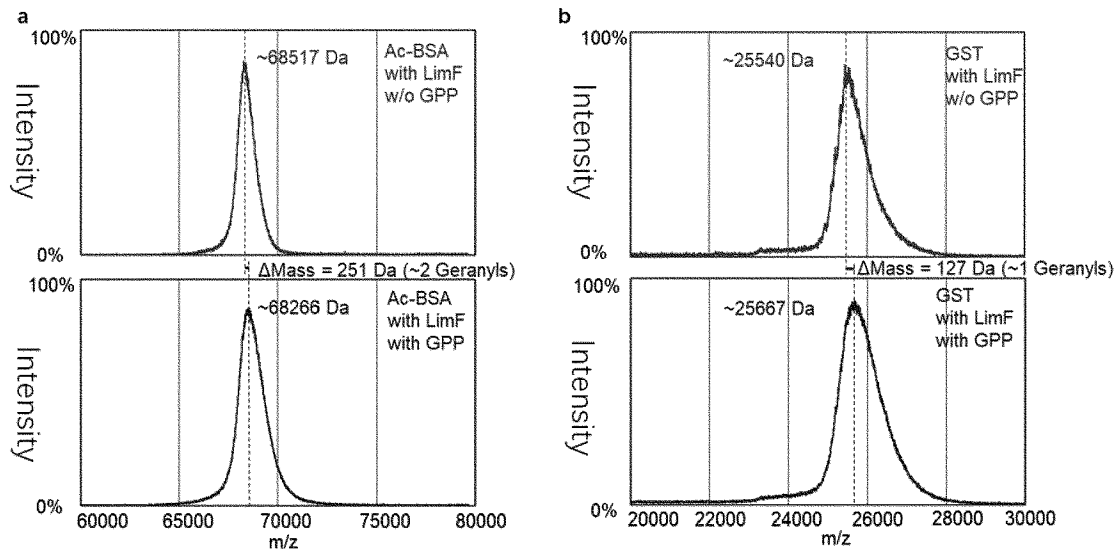
[図11]

enzyme \ substrate	bcLimE2	teR6		teR6-H5A
	HisGer	HisGer	TyrGer	TyrGer
LimF (wild type)	>99%	19%	35%	50%
LimF-E54A	<1%	<1%	<1%	<1%
LimF-E54Q	<1%	<1%	<1%	2%
LimF-D70A	91%	<1%	65%	68%
LimF-H172A	<1%	<1%	4%	7%
LimF-H172F	<1%	<1%	5%	22%
LimF-H172L	2%	<1%	80%	87%

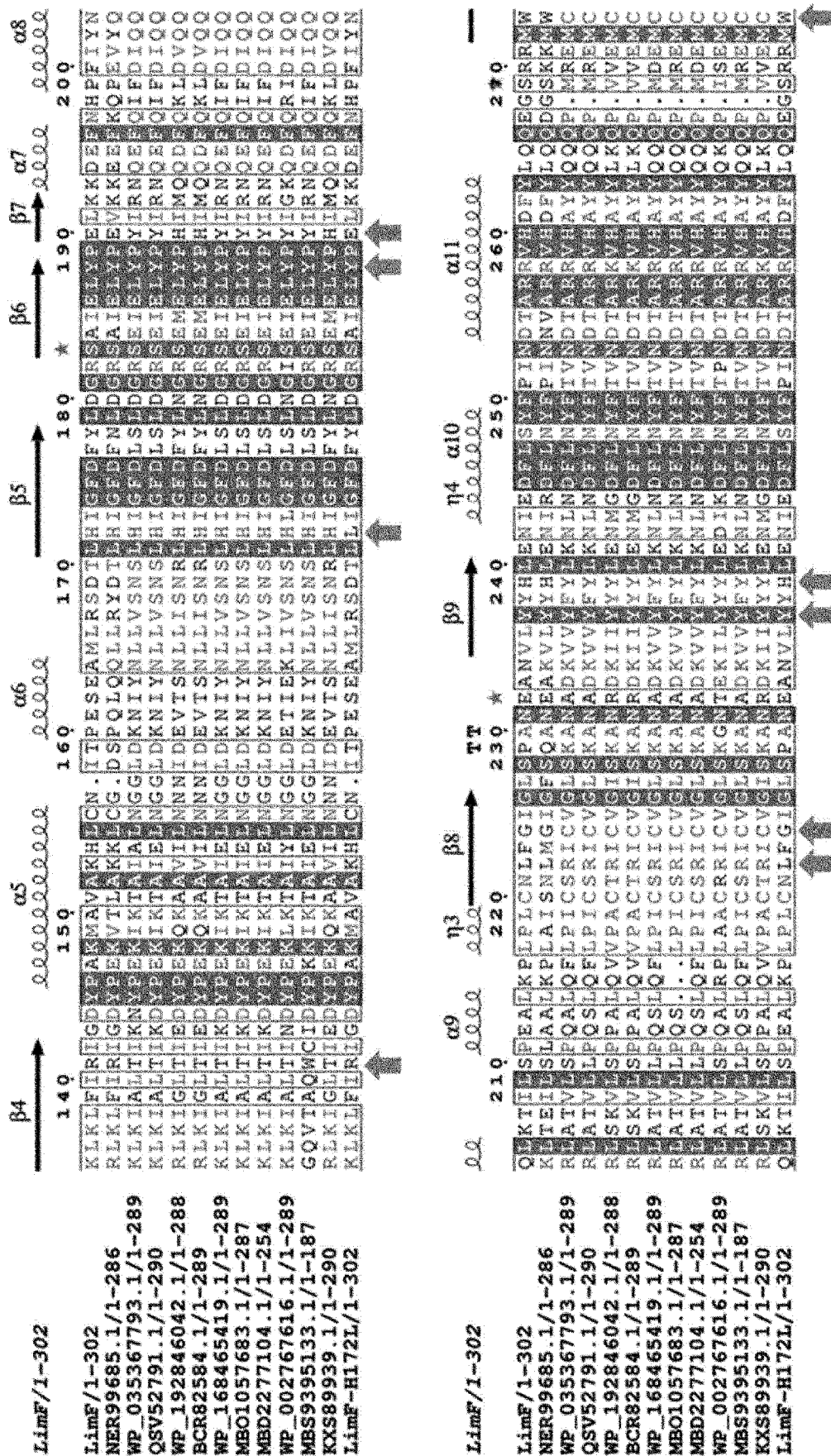
[図12]



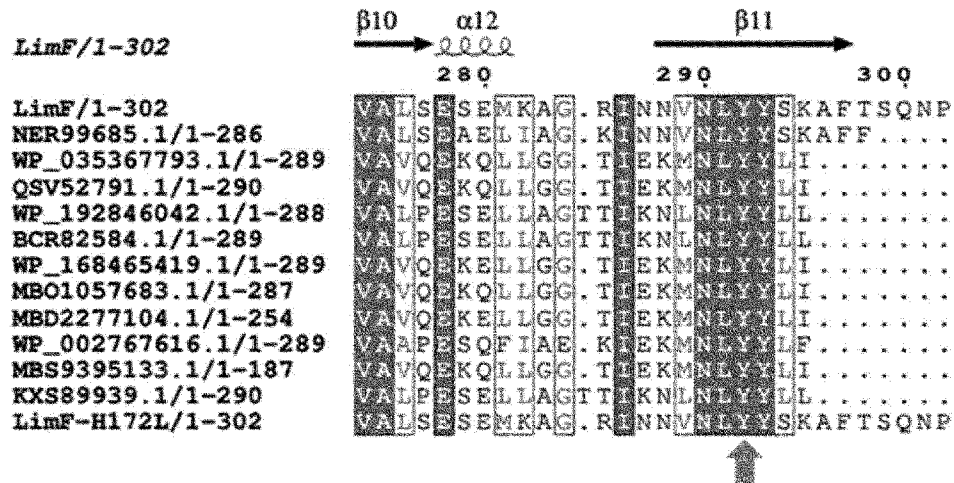
[図13]



[図14-1]



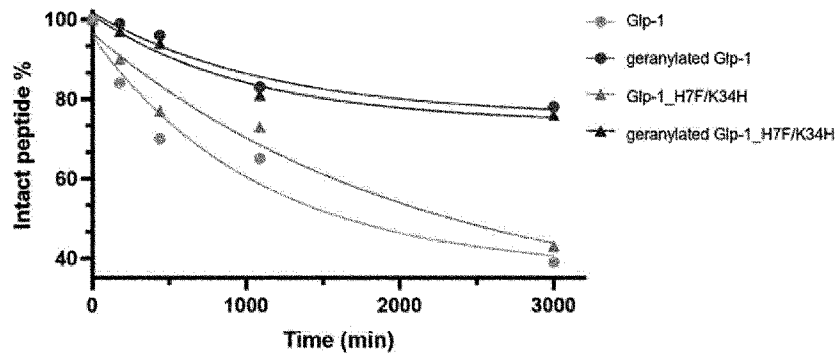
[図14-2]



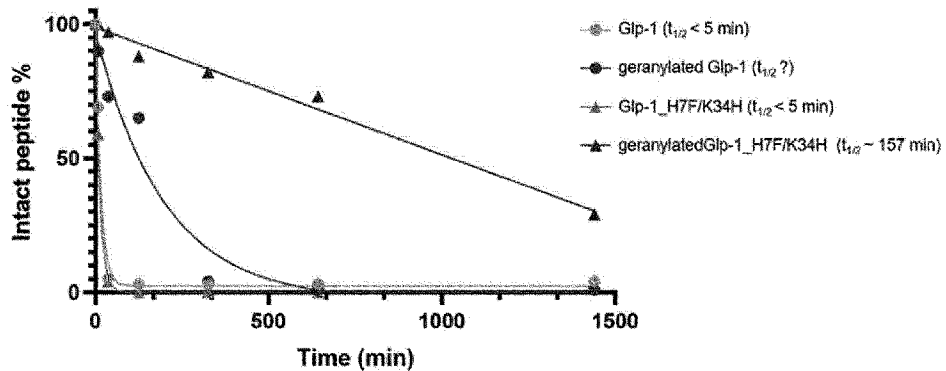
↑ : Prenyl-binding site residues

[図15]

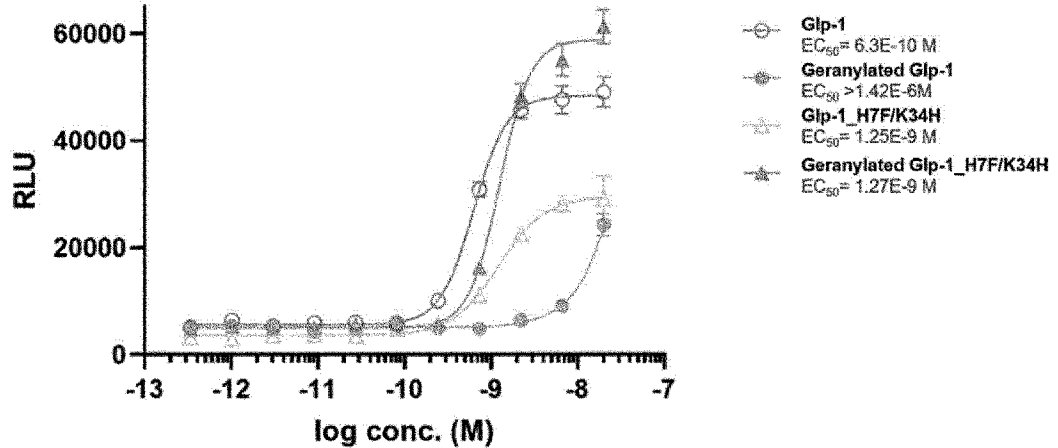
(a)



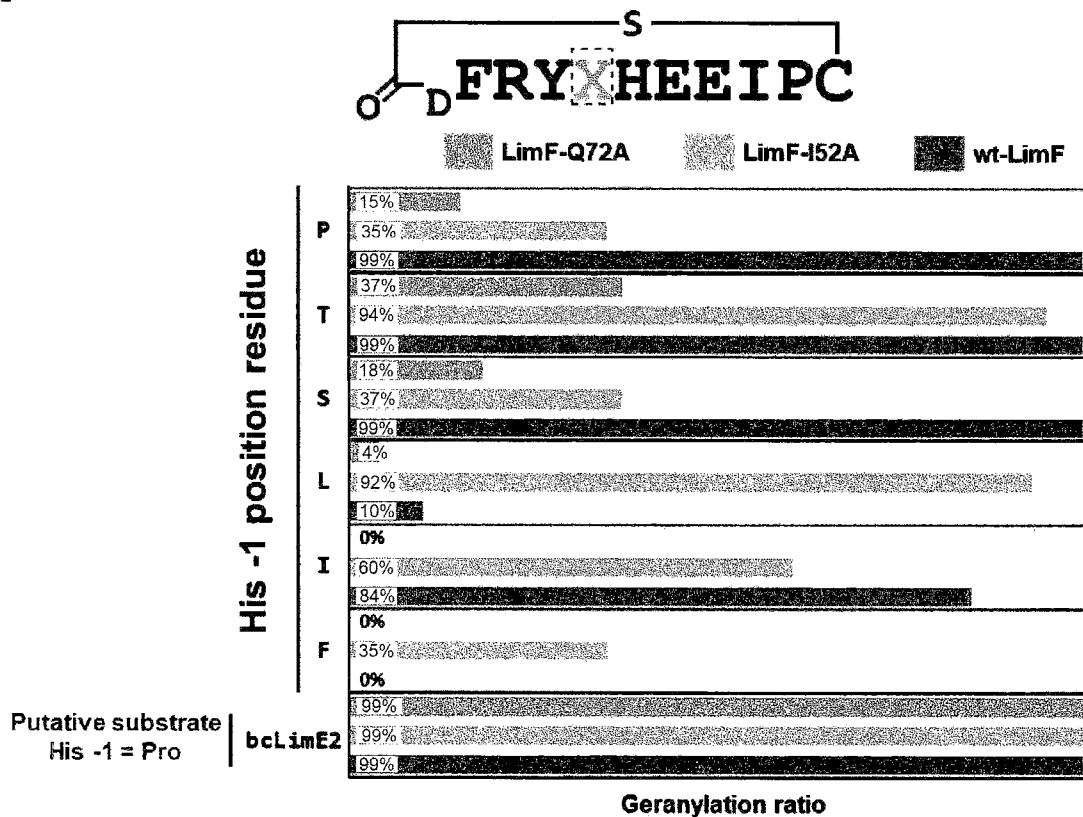
(b)



(c)



[図 16]

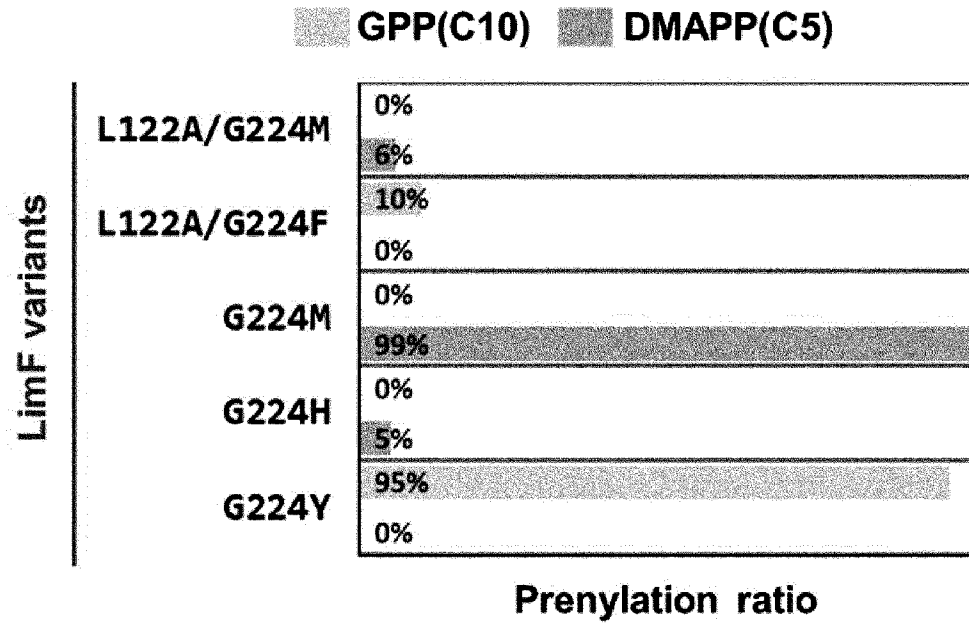


[図 17]

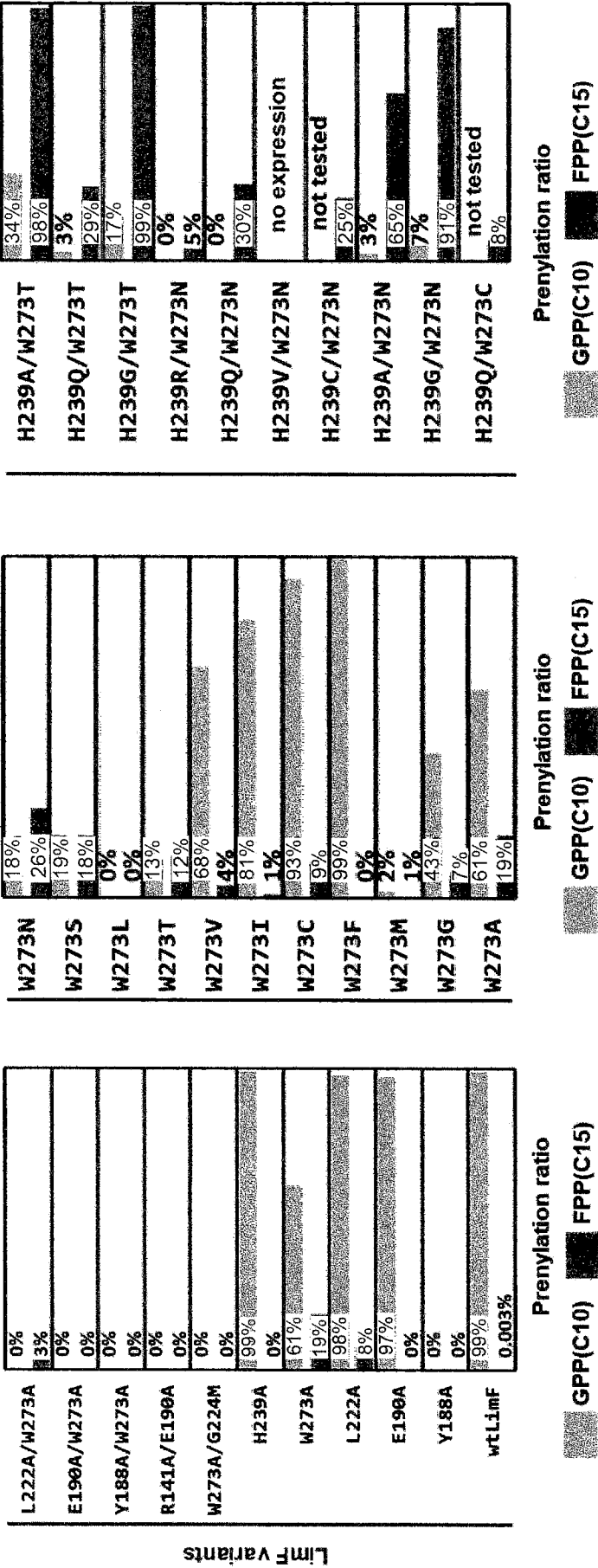
multiple sequence alignment

		210		220		224		230																		
	既知の	LimF ...	S	P	E	A	L	K	P	L	P	L	C	N	L	F	G	I	G	L	S	P	A	N	E	...
C10	修飾酵素	PirF ...	P	K	F	V	L	E	P	L	Q	V	T	N	L	F	G	F	G	F	S	K	T	N	H	...
		AgcF ...	S	P	P	A	L	Q	V	V	P	A	C	T	R	I	C	V	G	I	S	K	A	N	R	...
		ToiF ...	S	E	K	V	F	Y	L	L	E	A	C	D	L	F	M	A	G	F	S	K	A	N	T	...
		KgpF ...	C	A	P	A	L	R	L	V	N	D	C	Q	A	I	Q	I	G	V	S	R	A	N	D	...
	既知の	PagF ...	P	K	T	A	L	Q	P	L	K	A	S	S	L	F	F	T	G	L	S	K	A	N	N	...
C5	修飾酵素	AcyF ...	S	A	P	A	L	N	I	L	D	N	F	S	S	V	L	I	G	F	T	Q	T	N	Q	...
		TruF ...	S	H	K	V	T	S	L	L	Q	E	V	A	A	L	T	V	G	F	S	K	E	N	P	...
		LynF ...	S	P	K	V	S	S	L	L	D	A	S	D	F	F	V	G	G	F	S	K	A	N	V	...

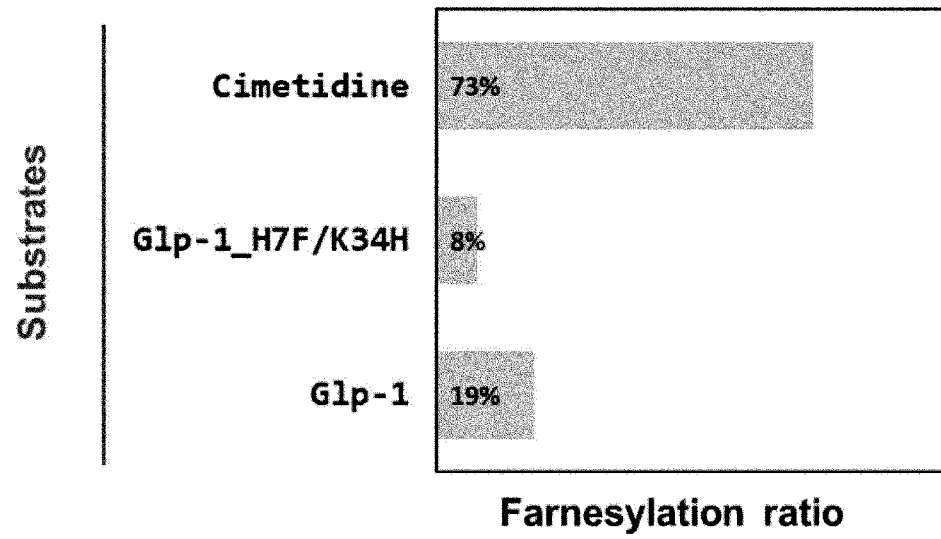
[図18]



[図 19]



[図20]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/113(2006.01)i; **C40B 40/08**(2006.01)i; **C40B 40/10**(2006.01)i; **C12N 15/11**(2006.01)i; **C12P 21/02**(2006.01)i;
C12N 9/10(2006.01)i

FI: C07K1/113 ZNA; C40B40/10; C12P21/02 C; C40B40/08; C12N9/10; C12N15/11 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/113; C40B40/08; C40B40/10; C12N15/11; C12N9/10; C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAO, Yue et al. Molecular basis for the broad substrate selectivity of a peptide prenyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016, vol. 113, no. 49, pp. 14037-14042, doi:10.1073/pnas.1609869113	1-2, 10-12
Y	abstract, results, fig. 1, 6, table 1	1-14
X	MORITA, Maho et al. Post-Translational Tyrosine Geranylation in Cyanobactin Biosynthesis. Journal of the American Chemical Society. 2018, vol. 140, pp. 6044-6048, doi:10.1021/jacs.8b03137	1-2, 10-12
Y	abstract, table 1, fig. 1	1-14
X	BANDARI, Chandrasekhar et al. Determination of Alkyl-Donor Promiscuity of Tyrosine-O-Prenyltransferase SirD from Leptosphaeria maculans. ChemBioChem. 2017, vol. 18, pp. 2323-2327, doi:10.1002/cbic.201700469	1
Y	abstract, scheme 1	1-9, 11-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2022

Date of mailing of the international search report

27 December 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038924**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/080490 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 23 April 2020 (2020-04-23) claims, etc.	1-14
Y	FAN, Aili et al. A new member of the DMATS superfamily from <i>Aspergillus niger</i> catalyzes prenylations of both tyrosine and tryptophan derivatives. <i>Appl. Microbial. Biotechnol.</i> 2014, vol. 98, pp. 10119-10129, doi:10.1007/s00253-014-5872-7 abstract, discussion	1-14
Y	FAN, Aili et al. Prenylation of tyrosine and derivatives by a tryptophan C7-prenyltransferase. <i>Tetrahedron Letters.</i> 2014, vol. 55, pp. 5199-5202, doi:10.1016/j.tetlet.2014.07.080 abstract, table 1	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038924

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

The “form of an Annex C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/038924

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)	
WO	2020/080490	A1	23 April 2020	EP	3879013	A1			
claims									

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 1/113(2006.01)i; C40B 40/08(2006.01)i; C40B 40/10(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i; C12N 9/10(2006.01)i FI: C07K1/113 ZNA; C40B40/10; C12P21/02 C; C40B40/08; C12N9/10; C12N15/11 Z		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K1/113; C40B40/08; C40B40/10; C12N15/11; C12N9/10; C12P21/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	HAO Yue et al., Molecular basis for the broad substrate selectivity of a peptide prenyltransferase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, Vol.113, No.49, p.14037-14042, doi:10.1073/pnas.1609869113 Abstract, Results, Fig.1,6, Table1	1-2,10-12
Y		1-14
X	MORITA Maho et al., Post-Translational Tyrosine Geranylation in Cyanobactin Biosynthesis, Journal of the American Chemical Society, 2018, Vol.140, p.6044-6048, doi:10.1021/jacs.8b03137 ABSTRACT, Table 1, Figure 1	1-2,10-12
Y		1-14
X	BANDARI Chandrasekhar et al., Determination of Alkyl-Donor Promiscuity of Tyrosine-O-Prenyltransferase Srd from Leptosphaeria maculans, ChemBioChem, 2017, Vol.18, p.2323-2327, doi:10.1002/cbic.201700469 Abstract, Scheme 1	1
Y		1-9,11-14
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.12.2022		国際調査報告の発送日 27.12.2022
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 坂崎 恵美子 4B 9451 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	W0 2020/080490 A1 (国立大学法人東京大学) 23.04.2020 (2020 - 04 - 23) 特許請求の範囲など	1-14
Y	FAN Aili et al., A new member of the DMATS superfamily from <i>Aspergillus niger</i> catalyzes prenylations of both tyrosine and tryptophan derivatives, <i>Appl. Microbial. Biotechnol.</i> , 2014, Vol.98, p.10119-10129, doi:10.1007/s00253-014-5872-7 Abstract, Discussion	1-14
Y	FAN Aili et al., Prenylation of tyrosine and derivatives by a tryptophan C7-prenyltransferase, <i>Tetrahedron Letters</i> , 2014, Vol.55, p.5199-5202, doi:10.1016/j.tetlet.2014.07.080 ABSTRACT, Table1	1-14

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、P C T 規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(P C T 規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式 (P C T 規則13の3.1(b)及びP C T 実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書C/ST.25テキストファイル形式」は、「ST26形式」と読み替える。

国際出願番号
PCT/JP2022/038924

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2020/080490	A1	23.04.2020	EP	3879013	A1	
				Claims			