

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6332965号
(P6332965)

(45) 発行日 平成30年5月30日 (2018. 5. 30)

(24) 登録日 平成30年5月11日 (2018. 5. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02 Z N A C

C O 7 K 2/00 (2006. 01)

C O 7 K 2/00

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 4 O B 30/04 (2006. 01)

C 4 O B 30/04

C 4 O B 40/10 (2006. 01)

C 4 O B 40/10

請求項の数 13 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-503634 (P2013-503634)

(86) (22) 出願日 平成24年3月9日 (2012. 3. 9)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/056181

(87) 国際公開番号 W02012/121392

(87) 国際公開日 平成24年9月13日 (2012. 9. 13)

審査請求日 平成27年3月3日 (2015. 3. 3)

審査番号 不服2017-9236 (P2017-9236/J1)

審査請求日 平成29年6月23日 (2017. 6. 23)

(31) 優先権主張番号 特願2011-52219 (P2011-52219)

(32) 優先日 平成23年3月9日 (2011. 3. 9)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 504137912

国立大学法人 東京大学

東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74) 代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74) 代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74) 代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74) 代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72) 発明者 菅 裕明

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アゾリン化合物及びアゾール化合物のライブラリー、並びにその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I)

A - (Xaa0) m - B (I)

[式中、m個のXaa0は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0~100アミノ酸からなるペプチドを示す。]

で示されるペプチドにおいて、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーの製造方法であって：

N末端から順に、PatDによる認識配列1、- (Xaa0) m -、及びPatDによる認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAライブラリーを製造する工程と（ここで、認識配列1及び2は、0~10アミノ酸からなるPatDによる認識配列をいい、認識配列1及び2の有無は任意である。）；

前記mRNAライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させ、ペプチドライブラリーを製造する工程と；

PatDと、前記ペプチドライブラリーとを、PatDの基質のリーダー配列を任意で含むペプチド（ただし、認識配列1、認識配列2、及びリーダー配列を含まないペプチドは除く。）

の存在下で反応させ、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログ

10

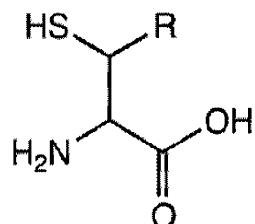
20

の少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と（ここでリーダー配列は、0～50アミノ酸からなるPatDの基質のリーダー配列をいい、リーダー配列の有無は任意である。）、を含み、

Cys、Ser、Thr、及び2,3-ジアミノ酸のアナログは、以下の構造：

Cysのアナログ；

【化1】

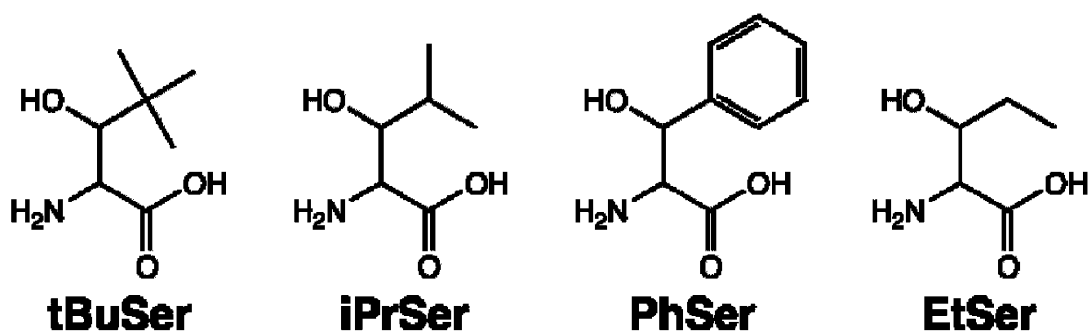


10

[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

Serのアナログ；

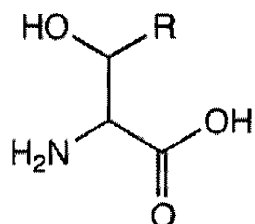
【化2】



20

Thrのアナログ；

【化3】

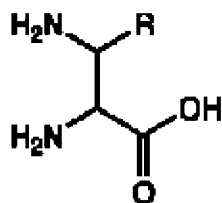


30

[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

2,3-ジアミノ酸のアナログ；

【化4】



40

[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

により表されるアナログである、方法。

【請求項2】

下記式（I）

50

A - (Xaa0)_m - B (I)

[式中、m個のXaa0は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0~100アミノ酸からなるペプチドを示す。]

で示されるペプチドにおいて、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物と、前記式(I)で示されるペプチドをコードするmRNAとの複合体を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーの製造方法であって：

N末端から順に、PatDによる認識配列1、-(Xaa0)_m-、及びPatDによる認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAライブラリーを製造する工程と(ここで、認識配列1及び2は、0~10アミノ酸からなるPatDによる認識配列をいい、認識配列1及び2の有無は任意である。);

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;

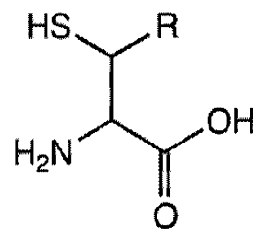
前記ピューロマイシン結合mRNAライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させ、ペプチド-mRNA複合体ライブラリーを製造する工程と;

PatDと、前記ペプチド-mRNA複合体ライブラリーとを、PatDの基質のリーダー配列を任意で含むペプチド(ただし、認識配列1、認識配列2、及びリーダー配列が存在しないペプチドを除く。)の存在下で反応させ、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と(ここでリーダー配列は、0~50アミノ酸からなるPatDの基質のリーダー配列をいい、リーダー配列の有無は任意である。)、を含み、

Cys、Ser、Thr、及び2,3-ジアミノ酸のアナログは、以下の構造：

Cysのアナログ;

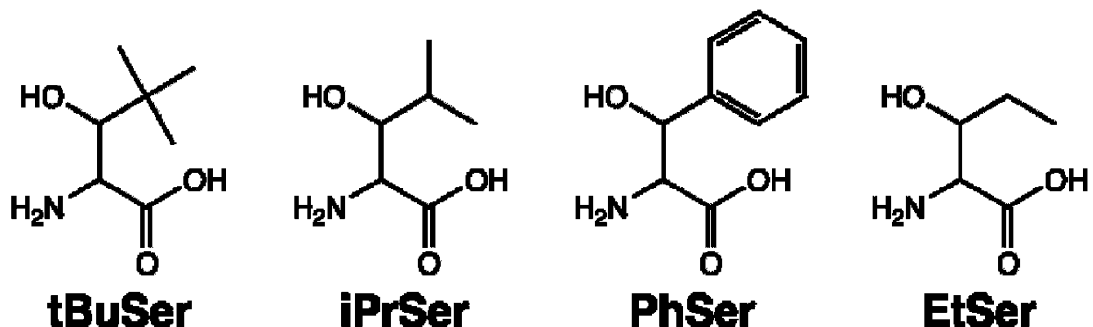
【化5】



[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1-10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

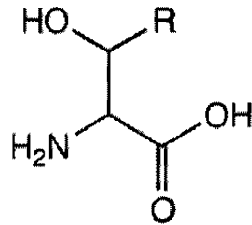
Serのアナログ;

【化6】



Thrのアナログ;

【化 7】

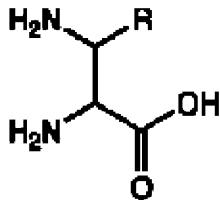


[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

10

2,3-ジアミノ酸のアナログ；

【化 8】



[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

20

により表されるアナログである、方法。

【請求項 3】

前記式 (I) において、 - (Xaa0) m - が、 - (Xaa1 - Xaa2) n - であり [式中、n個のXaa1は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、n個のXaa2は、それぞれ独立にCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、nは、1から20より選択される整数を示す。]、

前記アゾリン化合物には、Xaa1及びXaa2のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されている、請求項 1 又は 2 に記載のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法。

【請求項 4】

30

前記式 (I) で示されるペプチドの少なくとも1つを、以下の(i) ~ (iv)の少なくとも1つの特徴を有するペプチドとする、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法：

(i) mが2から40である（但し、7及び8を除く）；

(ii) nが1から20である（但し、3及び4を除く）；

(iii) Xaa1の少なくとも1つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa1の少なくとも1つが親水性アミノ酸である。

【請求項 5】

前記 - (Xaa0) m - で示されるペプチドの少なくとも1つを、配列番号：10 ~ 57のいずれかで表されるペプチドとする、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記アゾリン化合物の少なくとも1つが、アゾリン骨格を5以上有する、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記mRNAライブラリーの各mRNAは、前記リーダー配列を含むペプチドが、前記認識配列1、 - (Xaa0) m - 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとの融合ペプチドとして発現されるように構成されている、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記アゾリン骨格の導入後、リーダー配列を前記前駆体ペプチドから切断する工程を含む、請求項 7 に記載の方法。

50

【請求項 9】

前記アゾリン骨格を導入する工程において、前記リーダー配列を含むペプチドと、前記認識配列1、- (Xaa0) m -、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとが別個のペプチドである、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

さらに、前記アゾリン化合物を大環状化する工程を含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

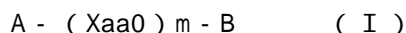
標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するスクリーニング方法であって、
請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリ
ーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、
前記標的物質と結合したアゾリン化合物を選択する工程と、を含む方法。 10

【請求項 12】

標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するスクリーニング方法であって、
請求項 2 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリ
ーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、
前記標的物質と結合したアゾリン化合物を選択する工程と、
前記選択したアゾリン化合物のペプチド部分をコードするmRNAの塩基配列を解析する工
程と、を含む方法。 20

【請求項 13】

下記式 (I)



[式中、m個のXaa0は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0～100アミノ酸からなるペプチドを示す。]

で示されるペプチドにおいて、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物の製造方法であって：

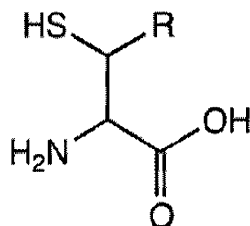
N末端から順に、PatDによる認識配列1、- (Xaa0) m -、及びPatDによる認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNA製造する工程と（ここで、認識配列1及び2は、0～10アミノ酸からなるPatDによる認識配列をいい、認識配列1及び2の有無は任意である。）； 30

前記mRNAを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させる工程と；

PatDと、前記前駆体ペプチドとを、PatDの基質のリーダー配列を任意で含むペプチド（ただし、認識配列1、認識配列2、及びリーダー配列を含まないペプチドは除く。）の存在下で反応させ、Xaa0のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と（ここで、前記リーダー配列を含むペプチドと、前記認識配列1、- (Xaa0) m -、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドであり、リーダー配列の有無は任意である。）を含み、

Cys、Ser、Thr、及び2,3-ジアミノ酸のアナログは、以下の構造： 40
Cysのアナログ；

【化 9】

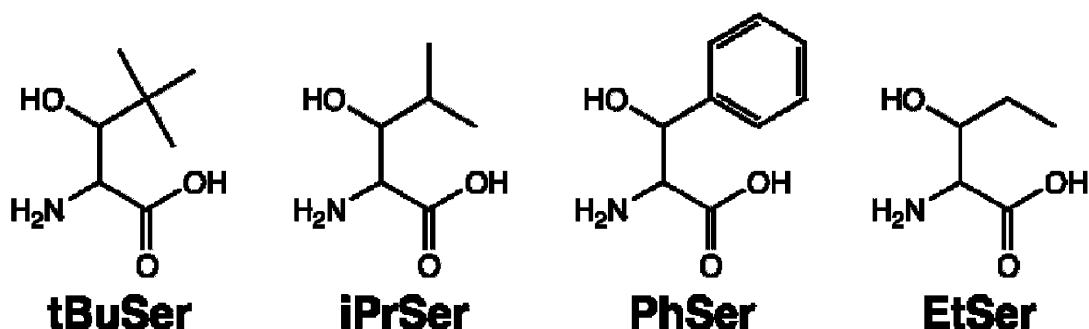


[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換 50

基を有していてもよい芳香族基を示す。]

Serのアナログ；

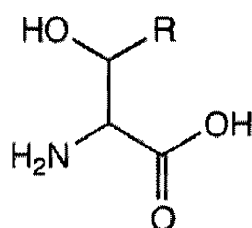
【化10】



10

Thrのアナログ；

【化11】

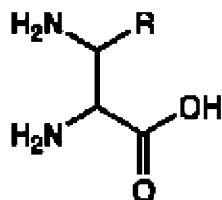


20

[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

2,3-ジアミノ酸のアナログ；

【化12】



30

[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

により表されるアナログである、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アゾリン化合物及びアゾール化合物のライブラリー等に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、様々なペプチドが、医薬品候補や研究用ツールとして注目されており、ペプチドライブラリーを開発し、標的物質に親和性を有するペプチドをスクリーニングしようとする様々な試みがなされている。

人工的にペプチドライブラリーを作製する方法としては、従来、化学合成による方法、二次代謝産物の生合成酵素を用いる方法、翻訳合成系などが用いられている。

しかしながら、化学合成による方法では、ライブラリーの多様性を大きくするのが困難である。また、スクリーニングや、化合物の構造と活性の相関解析にも時間を要する。

40

50

これに対し、二次代謝産物の生合成酵素を用いる方法によれば、迅速かつ簡便に、有機化学的手法では得られないような精巧な骨格の構築や化学変換が可能となる。しかしながら、酵素には基質特異性があるため、合成できる化合物の種類が限られ、大規模な化合物ライブラリーの構築に適用するのは難しい。

【0003】

細胞を使った翻訳合成系によれば、mRNAライブラリーを作製し、これをワンポットで翻訳することによって短時間で多様性に富んだペプチドライブラリーを構築することができる。また、mRNAディスプレイ法等と組み合わせることにより、スクリーニングにより得られたペプチドと、これをコードする核酸の情報を同時に得ることができるので、遺伝子型と表現型を容易に関連づけることができる。このように、翻訳系によるペプチドライブラリーの合成には優れた点が多いが、産生できるのは、ほぼペプチド性の化合物に限られる。

10

ライブラリーを用いたスクリーニングでは、プロテアーゼ活性を有する標的物質を阻害する化合物を同定することもしばしば必要とされる。しかしながら、ペプチド性化合物のライブラリーは、プロテアーゼによって切断されてしまうので、標的物質の活性を阻害する化合物を効率よくスクリーニングすることができない。

【0004】

翻訳後修飾酵素により、in vitroでペプチドライブラリーの各ペプチドを修飾することもあるが、所望の活性を有する酵素がin vitroで活性を有するとは限らない。また、酵素と反応させる前に、発現させたペプチドライブラリーを精製しなければならず、酵素の基質特異性も検討しなければならないので、所望の構造のペプチドで構成されるライブラリーを得ることは容易ではない。

20

修飾の有無や程度が特定できないライブラリーは、結局、化学合成系と同様に構造と活性の相関解析が必要となるため、有用性に劣るという問題がある。

【0005】

ところで、ホヤの共生藻Prochloron didemniが産生するpatellamideは、様々な生理活性を有すると考えられる低分子環状ペプチドであり、patA~Gからなるpat遺伝子群の産物によるユニークな経路で生合成される。pat遺伝子群と、この生合成経路の概略を図15に示す。

この生合成において前駆体となるのは、patE遺伝子産物のPatEペプチドである。patE遺伝子は超可変領域（カセット領域）を有するため、その産物は天然のコンビナトリアルライブラリーを構築する。

30

PatEペプチドは、カセット領域の両側に、翻訳後修飾酵素による認識配列を有する。翻訳後修飾酵素として働くのは、PatA、PatD及びPatGである。PatDは、PatEのカセットにおけるCys、Ser、及びThrにアゾリン骨格を導入し、Cysをチアゾリン骨格に、Ser及びThrをオキサゾリン骨格に変換する。

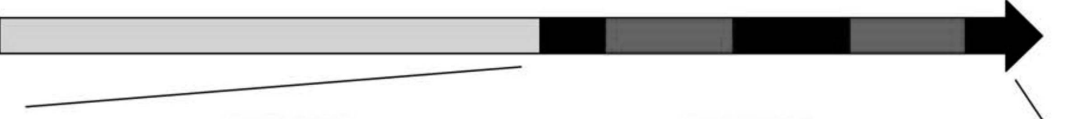
PatAは、PatEのカセット領域のN末端側の認識配列を切断する。

PatGは、2つのドメインからなり、N末端のオキシダーゼドメインは、PatDにより導入されたアゾリン骨格をアゾール骨格に、即ちチアゾリン骨格をチアゾール骨格に変換する。C末端側のペプチダーゼドメインは、PatEのカセット領域のC末端側の認識配列を切断しながら大環状化する。

40

【0006】

上述した天然のPatEのカセット領域について、M.S. Donia et al.（非特許文献1）には、下表に示す配列が記載されている。

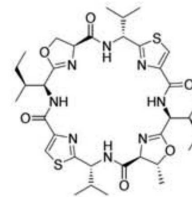


G L E A S COMPOUND I A Y D G V E P S COMPOUND II A Y D G E Stop
 GGT TTGGAAGCATCTGTAACTGCTTGCATCACATTTTGGCGCTTATGATGGTGGAGCCATCTATAACTGTTTGCATCAGTGT TTGCGCTTATGATGGTGAATAA

T-----
 T-----A-----
 T-----G-----
 T-----C-----
 T-----G-----
 T-----C-----
 T-----C-----
 T-----GC-----T-----C-----T-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----G-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----G-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----AC-----T-----C-----
 T-----G-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----C-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----A-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----C-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----C-----ATGC-----TCT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----C-----C-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TGTGCT-----A-----T-----C-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CC-----A-----T-----C-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TGT-----CCT-----C-----T-----C-----
 T-----ATGC-----C-----A-----TGTGCC-----A-----T-----C-----
 T-----ATGC-----CT-----A-----TAT-----CCT-----A-----T-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----C-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----A-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----A-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----A-----T-----T-----C-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----A-----T-----T-----C-----C-----
 T-----C-----T-----T-----C-----A-----T-----T-----C-----C-----

 * * * * *
 * * * * *

COMPOUND	CODING SEQUENCE
patellamide family:	
patellamide C (E1I, E2I)	V T A C I T F C
patellamide A (E1II)	I T V C I S V C
patellamide B (E4I, E5I)	L T A C I T F C
new compound 1 (E6I)	V A A C I T F C
new compound 2 (E7I)	L T T C I T F C
new compound 3 (E8I)	L T A C V T F C
new compound 4 (E9II)	I T V C I T V C
new compound 5 (E10I)	L A A C I T F C
new compound 6 (E11I)	L T A C I T L C
new compound 7 (E12II)	I T V C I S A C
new compound 8 (E13II)	S T V C F T V C
new compound 9 (E15I)	V T A C I A F C
new compound 10 (E16I)	V T A C I T S C
new compound 11 (E17I)	V T A C I T L C
new compound 12 (E18I)	V T T C I T F C
new compound 13 (E20I)	V T A C T T F C
ulithiacyclamide family:	
ulithiacyclamide (E2II)	C T L C C T L C
new compound 14 (E14II)	C T L C C T L R
new compound 15 (E19II)	C I L C C T L C
new compound 16 (E21II)	C T L C C A L C
new compound 17 (E22II)	C T L C C T V C
new compound 18 (E23II)	C T L C C T F C
new compound 19 (E24II)	C T V C C A V C
new compound 20 (E25II)	C T L C Y T L C
lissoclinamide family:	
lissoclinamide 2/3 (E3I)	A C F P T I C
lissoclinamide 4/5 (E3II)	F C F P T V C
new compound 21 (E26II)	L C F P T V C
new compound 22 (E27II)	F C V P T V C
new compound 23 (E28II)	F C F P A V C
new compound 24 (E29II)	F C L P T V C



The chemical structure shows a cyclic peptide with a disulfide bridge. The backbone consists of a 12-membered ring formed by amide bonds. A disulfide bridge (S-S) connects two cysteine residues. The side chains include isopropyl groups and a thioether group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

この表によると、天然のカセット領域の配列には、(i) 7又は8残基である、(ii) カセット領域のN末端から2、4、6、8番目に、修飾を受けるSer/Thr/Cysが位置することが多い、(iii) 修飾を受ける残基 (Ser/Thr/Cys) は並ぶことが少ない、(iv) Ser/Thr/Cys以外

の残基には、Val、Ala、Ile、Phe、Leuなどの疎水性残基が多い、などの共通点がある。

従って、これらの共通点は、翻訳後修飾酵素であるPatD及びPatGの基質となるために必要であるようにも考えられた。しかしながら、これらのSer/Thr/Cysのうち、どれが修飾されているのか、されていないのかも不明であり、PatD及びPatGの基質特異性についてはこれまで明らかとなっていなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Donia, M.S. et al., Nat. Chem. Biol., 2006, 2:729-735.

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、十分な多様性を有し、プロテアーゼ活性を有する標的物質に結合する化合物のスクリーニングにも用いることができるライブラリーを効率よく製造する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】

【0010】

本発明者らは、何らかの方法で天然のものより多様性に富んだPatEライブラリーを効率よく得ることができ、且つ、これを基質として翻訳後修飾酵素による修飾を加えることができれば、プロテアーゼ活性を有する標的物質に結合する化合物のスクリーニングにも用

20

いることができるライブラリーを得ることができ、上記課題を解決できるものと考えた。そして研究を重ねた結果、ある種のアゾリン骨格導入酵素はin vitroでもアゾリン骨格形成活性を有すること；かかるアゾリン骨格導入酵素の基質となるカセット領域の配列は、M.S. Donia et al.に記載されたものに限られず、カセット領域を2 - 40アミノ酸残基とすれば当該酵素の基質となり、カセット領域中のCys、Ser、Thr及び2,3-ジアミノ酸とこれらのアナログがアゾリン骨格へと変換されうることを見出した。

さらに、N末端から順に、PatEのリーダー配列、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、カセット領域、及びアゾリン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドとして、PatEライブラリーを無細胞翻訳系により発現させ、これをアゾリン骨格導入酵素で修飾し、不要な領域を切断するという工程をワンポットで効率よく行うことができ、その結果、十分多様性に富み、プロテアーゼ活性を有する標的物質を用いるスクリーニングにも利用できるアゾリン化合物ライブラリーを得ることができることを確認した。

30

また、上記前駆体ペプチドにおいて、PatEのリーダー配列を従来知られていたリーダー配列の一部のみとした場合や完全に除去した場合、認識配列1及び2として従来知られていた配列とは異なる配列を用いた場合、認識配列1及び2を除去した場合などにも、該前駆体ペプチドがアゾリン骨格導入酵素の基質となりうることを見出した。さらに、リーダー配列部分を、カセット領域を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドとしても、当該ペプチドが反応系に存在すれば、カセット領域を含む前駆体ペプチドがアゾリン骨格導入酵素の基質となりうることを確認し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、

40

〔1〕下記式(Ⅰ)

$A - (Xaa_0)_m - B$ (Ⅰ)

〔式中、m個の Xaa_0 は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0~100アミノ酸からなるペプチドを示す。〕

で示されるペプチドにおいて、 Xaa_0 のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーの製造方法であって：

N末端から順に、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及びアゾリ

50

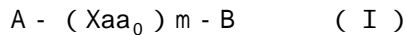
ン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAライブラリーを製造する工程と（ここで、認識配列1及び2は、0～10アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素による認識配列をいう。）；

前記mRNAライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させ、ペプチドライブラリーを製造する工程と；

アゾリン骨格導入酵素と、前記ペプチドライブラリーとを、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、Xaa₀のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と（ここでリーダー配列は、0～50アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列をいう）、を含む方法；

10

〔2〕下記式（Ⅰ）



〔式中、m個のXaa₀は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0～100アミノ酸からなるペプチドを示す。〕

で示されるペプチドにおいて、Xaa₀のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物と、前記式（Ⅰ）で示されるペプチドをコードするmRNAとの複合体を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーの製造方法であって；

20

N末端から順に、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、- (Xaa₀)_m -、及びアゾリン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAライブラリーを製造する工程と（ここで、認識配列1及び2は、0～10アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素による認識配列をいう。）；

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ライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させ、ペプチド-mRNA複合体ライブラリーを製造する工程と；

アゾリン骨格導入酵素と、前記ペプチド-mRNA複合体ライブラリーとを、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、Xaa₀のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と（ここでリーダー配列は、0～50アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列をいう）、を含む方法；

30

〔3〕前記式（Ⅰ）において、- (Xaa₀)_m - が、- (Xaa₁ - Xaa₂)_n - であり

〔式中、n個のXaa₁は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、n個のXaa₂は、それぞれ独立にCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、nは、1から20より選択される整数を示す。〕、

前記アゾリン化合物には、Xaa₁及びXaa₂のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されている、上記〔1〕又は〔2〕に記載のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法；

40

〔4〕前記式（Ⅰ）で示されるペプチドの少なくとも1つを、以下の(i)～(iv)の少なくとも1つの特徴を有するペプチドとする、上記〔1〕から〔3〕のいずれか1項に記載の方法；

(i) mが2から40である（但し、7及び8を除く）；

(ii) nが1から20である（但し、3及び4を除く）；

(iii) Xaa₁の少なくとも1つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa₁の少なくとも1つが親水性アミノ酸である；

〔5〕前記- (Xaa₀)_m - で示されるペプチドの少なくとも1つを、配列番号：10～57のいずれかで表されるペプチドとする、上記〔1〕から〔3〕のいずれか1項に記載の方

50

法；

〔 6 〕前記アゾリン化合物の少なくとも1つが、アゾリン骨格を5以上有する、上記〔 1 〕から〔 5 〕のいずれか1項に記載の方法；

〔 7 〕前記mRNAライブラリーの各mRNAは、前記リーダー配列を含むペプチドが、前記認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとの融合ペプチドとして発現されるように構成されている、上記〔 1 〕から〔 6 〕のいずれか1項に記載の方法；

〔 8 〕前記アゾリン骨格の導入後、リーダー配列を前記前駆体ペプチドから切断する工程を含む、上記〔 7 〕に記載の方法；

〔 9 〕前記アゾリン骨格を導入する工程において、前記リーダー配列を含むペプチドと、前記認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとが別個のペプチドである、上記〔 1 〕から〔 6 〕いずれか1項に記載の方法；

〔 10 〕さらに、前記アゾリン化合物を大環状化する工程を含む、上記〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか1項に記載の方法；

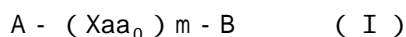
〔 11 〕アゾール化合物ライブラリーの製造方法であって、

上記〔 1 〕から〔 10 〕のいずれか1項に記載のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法において、

前記アゾリン骨格の導入工程の後、アゾリン骨格が導入されたライブラリーと、アゾール骨格導入酵素とを、アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下又は非存在下で反応させ、アゾリン骨格の少なくとも1つをアゾール骨格に変換する工程を含む方法（ここでリーダー配列は、0~50アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列をいう）；

〔 12 〕前記アゾール骨格導入酵素は、PatGのペプチダーゼドメインを欠損した変異体または点変異によってペプチダーゼ活性をなくした変異体である、上記〔 11 〕に記載の方法；

〔 13 〕下記式（ I ）



〔 式中、m個の Xaa_0 は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0~100アミノ酸からなるペプチドを示す。 〕

で示されるペプチドにおいて、 Xaa_0 のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーであって；

前記式（ I ）で示されるペプチドの少なくとも1つは、mが7又は8でない、アゾリン化合物ライブラリー；

〔 14 〕前記式（ I ）において、 $-(Xaa_0)_m-$ が、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ であり

〔 式中、n個の Xaa_1 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、n個の Xaa_2 は、それぞれ独立にCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、nは、1から10より選択される整数を示す。 〕、

前記式（ I ）で示されるペプチドの少なくとも1つが、以下の(i)から(iv)の少なくとも1つの特徴を有する、上記〔 13 〕に記載のアゾリン化合物ライブラリー；

(i) mが2から40である（但し、7及び8を除く）；

(ii) nが1から20である（但し、3及び4を除く）；

(iii) Xaa_1 の少なくとも1つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログ又はこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa_1 の少なくとも1つが親水性アミノ酸である；

〔 15 〕前記アゾリン化合物のそれぞれが、そのペプチド部分をコードするmRNAとの複合体を形成している、上記〔 13 〕又は〔 14 〕に記載のアゾリン化合物ライブラリー；

〔 16 〕上記式（ I ）で示されるペプチドのN末端及びC末端に、アゾリン骨格導入酵素の認識配列の全部または一部が結合している、上記〔 13 〕から〔 15 〕のいずれか1項に

10

20

30

40

50

記載のアゾリン化合物ライブラリー；

〔 17 〕下記式（ I ）

$A - (Xaa_0)_m - B$ （ I ）

〔 式中、 m 個の Xaa_0 は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、 m は、2から40より選択される整数を示し、 A 及び B は、それぞれ独立に0～100アミノ酸からなるペプチドを示す。 〕

で示されるペプチドにおいて、 Xaa_0 のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾール骨格が導入されているアゾール化合物を2種以上含むアゾール化合物ライブラリーであって；

10

前記式（ I ）で示されるペプチドの少なくとも1つは、 m が7又は8でない、アゾール化合物ライブラリー；

〔 18 〕前記式（ I ）において、 $-(Xaa_0)_m-$ が、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ であり

〔 式中、 n 個の Xaa_1 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、 n 個の Xaa_2 は、それぞれ独立にCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、 n は、1から20より選択される整数を示す。 〕、

前記式（ I ）で示されるペプチドの少なくとも1つが、以下の(i)から(iv)の少なくとも1つの特徴を有する、上記〔 17 〕に記載のアゾール化合物ライブラリー；

(i) m が2から40である（但し、7及び8を除く）；

(ii) n が1から20である（但し、3及び4を除く）；

20

(iii) Xaa_1 の少なくとも1つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa_1 の少なくとも1つが親水性アミノ酸である；

〔 19 〕前記アゾール化合物のそれぞれが、そのペプチド部分をコードするmRNAとの複合体を形成している、上記〔 17 〕又は〔 18 〕に記載のアゾール化合物ライブラリー；

〔 20 〕上記式（ I ）で示されるペプチドのN末端及びC末端に、アゾリン骨格導入酵素の認識配列の全部または一部が結合している、上記〔 17 〕から〔 19 〕のいずれか1項に記載のアゾール化合物ライブラリー；

〔 21 〕標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するスクリーニング方法であって、

上記〔 1 〕から〔 10 〕のいずれか1項に記載の方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリー又は上記〔 13 〕から〔 16 〕のいずれか1項に記載のアゾリン化合物ライブラリーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、

30

前記標的物質と結合したアゾリン化合物を選択する工程と、を含む方法；

〔 22 〕標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するスクリーニング方法であって、

上記〔 2 〕から〔 10 〕のいずれか1項に記載の方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリー又は上記〔 15 〕または〔 16 〕に記載のアゾリン化合物ライブラリーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、

前記標的物質と結合したアゾリン化合物を選択する工程と、

前記選択したアゾリン化合物のmRNAの塩基配列を解析する工程と、を含む方法；

〔 23 〕標的物質に結合するアゾール化合物を同定するスクリーニング方法であって、

40

上記〔 11 〕又は〔 12 〕に記載の方法で製造されたアゾール化合物ライブラリー又は上記〔 17 〕から〔 20 〕のいずれか1項に記載のアゾール化合物ライブラリーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、

前記標的物質と結合したアゾール化合物を選択する工程と、を含む方法；

〔 24 〕標的物質に結合するアゾール化合物を同定するスクリーニング方法であって、

上記〔 11 〕又は〔 12 〕に記載の方法で製造されたアゾール化合物ライブラリー又は上記〔 19 〕または〔 20 〕に記載のアゾール化合物ライブラリーと、標的物質とを接触させ、インキュベートする工程と、

前記標的物質と結合したアゾール化合物を選択する工程と、

前記選択したアゾール化合物のmRNAの塩基配列を解析する工程と、を含む方法；

50

〔 2 5 〕 標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するためのスクリーニング用キットであって、

上記〔 1 〕から〔 1 0 〕のいずれか 1 項に記載の方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリー又は上記〔 1 3 〕から〔 1 6 〕のいずれか 1 項に記載のアゾリン化合物ライブラリーを含む、キット；

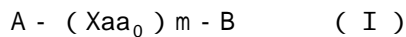
〔 2 6 〕 前記ライブラリーが、固相担体に固定されている、上記〔 2 5 〕に記載のキット；

〔 2 7 〕 標的物質に結合するアゾール化合物を同定するためのスクリーニング用キットであって、

上記〔 1 1 〕又は〔 1 2 〕に記載の方法で製造されたアゾール化合物ライブラリー又は上記〔 1 7 〕から〔 2 0 〕のいずれか 1 項に記載のアゾール化合物ライブラリーを含む、キット；

〔 2 8 〕 前記ライブラリーが、固相担体に固定されている、上記〔 2 7 〕に記載のキット；

〔 2 9 〕 下記式（ I ）



〔 式中、 m 個の Xaa_0 は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、 m は、2から40より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0～100アミノ酸からなるペプチドを示す。 〕

で示されるペプチドにおいて、 Xaa_0 のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物の製造方法であって；

N末端から順に、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及びアゾリン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNA製造する工程と（ここで、認識配列1及び2は、0～10アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素による認識配列をいう。）；

前記mRNAを用いて、無細胞翻訳系により前記前駆体ペプチドを発現させる工程と；

アゾリン骨格導入酵素と、前記前駆体ペプチドとを、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、 Xaa_0 のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程と（ここで、前記リーダー配列を含むペプチドと、前記認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドである。）を含む方法；

〔 3 0 〕 アゾール化合物の製造方法であって、

上記〔 2 9 〕に記載の方法で製造したアゾリン化合物と、アゾール骨格導入酵素とを、アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下又は非存在下で反応させ、アゾリン骨格の少なくとも1つをアゾール骨格に変換する工程を含む、方法；及び〔 3 1 〕 アゾリン化合物又はアゾール化合物の製造用キットであって、アゾリン骨格導入酵素又はアゾール骨格導入酵素と、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドとを含むキット、

に関する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 1 】

本発明に係る方法によれば、天然のPatEライブラリーよりもはるかに多様性に富んだアゾリン化合物ライブラリー及びアゾール化合物ライブラリーを、迅速且つ簡便な方法で得ることができる。

かかるアゾリン化合物又はアゾール化合物ライブラリーを用いれば、プロテアーゼ活性を有する標的物質に結合するアゾリン化合物又はアゾール化合物のスクリーニングを行うことが可能である。

また、本発明に係るアゾリン化合物又はアゾール化合物ライブラリーにmRNAディスプレイ

10

20

30

40

50

イ法を応用し、アゾリン化合物又はアゾール化合物とそのペプチド部分をコードするmRNAとの複合体のライブラリーを作製すれば、スクリーニングにより同定されたアゾリン化合物/アゾール化合物をコードする核酸配列を決定できるので、化合物の構造と活性との関係を容易に解析できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様を示す概略図である。

【図2】図2は、天然のPatEとカセット領域の配列が同一の前駆体ペプチドに、PatDでアゾリン骨格を導入する前後の質量分析の結果を示す。

【図3】図3は、カセット領域が12アミノ酸または16アミノ酸である前駆体ペプチドに、PatDでアゾリン骨格を導入する前後の質量分析の結果を示す。

【図4】図4は、Xaa₁に親水性アミノ酸残基を含む前駆体ペプチドに、PatDでアゾリン骨格を導入する前後の質量分析の結果を示す。

【図5】図5は、様々な配列のカセット領域に対するPatDによるアゾリン骨格の導入実験を行った結果に基づき、PatDの基質許容性をまとめた結果を示す。それぞれの配列において、PatD反応後に導入されたヘテロ環の数をボックス中の色の濃さを指標として示した。色が濃いものほど該当するヘテロ環導入数の産物が多く観測された事を意味し、色は薄い物は副産物として観測されたことを意味する。

【図6】図6は、Glu-Cによりリーダー配列の切断を、質量分析により確認した結果を示す。PatEC1wt-GSをPatD処理及びGlu-C処理した場合（PatEC1wt-GS +PatD+Glu-C）、基質ペプチド非存在下（+PatD+Glu-C）には見られなかったピークが観測され（1880.5）、それは4個のヘテロ環を含むC末端の短鎖ペプチド部位に相当する。

【図7】図7は、リーダー配列を別個のペプチドとして反応系に加えた場合、リーダー配列なしの場合のそれぞれについて、PatDの基質許容性を調べた結果である。

【図8】図8は、リーダー配列の一部を欠失させて、PatDの基質許容性を調べた結果の一例である。

【図9】図9は、認識配列を変更して、PatDの基質許容性を調べた結果である。

【図10A】図10Aは、カセット配列に非天然型アミノ酸を含む基質を翻訳合成し、PatDの基質許容性を調べた実験の概要を示す。

【図10B】図10Bは、図10Aの実験に用いた非天然型アミノ酸を示す。

【図11】図11は、図10の実験の代表的な結果を示す。

【図12】図12は、mRNAディスプレイ法を用いたスクリーニングの概略を示す。

【図13】図13は、MMP12を標的として行ったmRNAディスプレイ法によるスクリーニングのセレクトションの結果を示す。

【図14】図14は、図13の方法で選択されたアゾリン含有化合物のMMP12に対する結合能力評価の結果である。

【図15】図15は、pat遺伝子群の構造と、patellamideの生合成経路を示す概略図である。

【図16】図16は、天然基質からかけ離れた合成ペプチドに対するPatDの基質許容性を調べた結果の一例である。

【図17】図17は、天然基質からかけ離れた合成ペプチドに対するPatDの基質許容性を調べた結果の一例である。

【図18】図18は、リーダー配列として、Lacticin481前駆体由来またはヒトアクチン由来の配列を用いた場合、PatEのリーダー配列をシャッフルした配列を用いた場合について、PatDの基質許容性を調べた結果である。

【図19】図19は、リーダー配列の一部を欠失させ、PatDの基質許容性を調べた結果である。

【図20】図20は、リーダー配列に点変異を導入して、PatDの基質許容性を調べた結果である。

10

20

30

40

50

【図 2 1】図 9 は、認識配列を変更させて、PatD の基質許容性を調べた結果である。

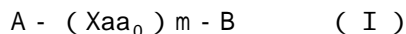
【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 3 】

(アゾリン化合物ライブラリーの製造方法)

本発明は、2 種以上のアゾリン化合物を含むアゾリン化合物ライブラリーの製造方法を提供する。

本明細書において「アゾリン化合物」とは、下記式 (I) で示されるペプチドの Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも 1 つにアゾリン骨格が導入されている化合物をいう。



[式中、m 個の Xaa_0 は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも 1 つは Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、m は、2 から 40 より選択される整数を示し、A 及び B は、それぞれ独立に 0 ~ 100 アミノ酸からなるペプチドを示す。]

【 0 0 1 4 】

本発明の一態様において、アゾリン化合物は、式 (I) における $-(Xaa_0)_m-$ が、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ である。

[式中、n 個の Xaa_1 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、n 個の Xaa_2 は、それぞれ独立に Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、n は、1 から 20 より選択される整数を示す。]

アゾリン骨格が導入された Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログは、 Xaa_1 の位置にあっても、 Xaa_2 の位置にあってもよい。

【 0 0 1 5 】

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、誘導体を含む。本明細書においてアミノ酸は、天然タンパク性 L-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体及び誘導体などの化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 γ -アラニン、オルニチンなどの天然非タンパク性アミノ酸；及びアミノ酸の特徴である当業界で公知の特性を有する化学的に合成された化合物などが挙げられる。非天然アミノ酸の例として、 β -メチルアミノ酸 (β -メチルアラニンなど)、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸 (β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 β -フルオロメチル-ヒスチジン及び γ -メチル-ヒスチジンなど)、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸 (「ホモ」アミノ酸) 及び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るアミノ酸 (システイン酸など) が挙げられる。

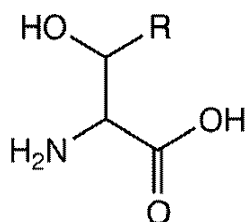
【 0 0 1 6 】

本明細書においてアミノ酸は、慣用される 1 文字表記又は 3 文字表記で表される。1 文字表記又は 3 文字表記で表されたアミノ酸は、それぞれその変異体、誘導体を含むものとする。

【 0 0 1 7 】

Thr のアナログとしては、例えば以下の式で表されるものが挙げられるがこれに限定されない。

【化 1】

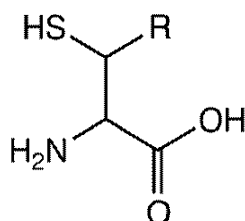


[式中、R は、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数 1 - 10 のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

【 0 0 1 8 】

Cysのアナログとしては、例えば以下の式で表されるものが挙げられるがこれに限定されない。

【化2】



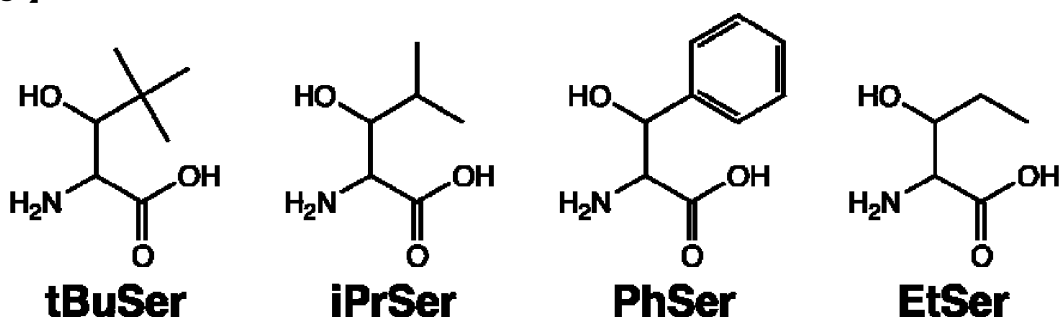
[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

10

【0019】

Ser、Thrのアナログとしては、例えば以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【化3】

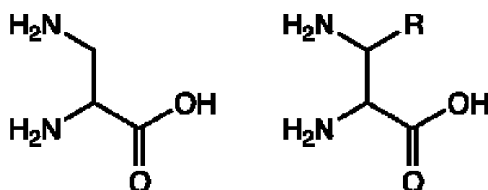


20

【0020】

また、2,3-ジアミノ酸及びそのアナログとしては、例えば以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【化4】



30

Dap

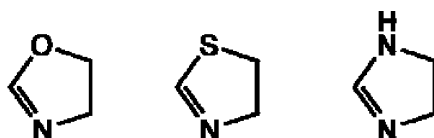
[式中、Rは、水素原子又は置換基を有していてもよい炭素数1 - 10のアルキル基又は置換基を有していてもよい芳香族基を示す。]

【0021】

本明細書において、「Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されている」とは、Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸において脱水反応が生じ、下記式で示されるアゾリン環が導入されることを意味する。

40

【化5】

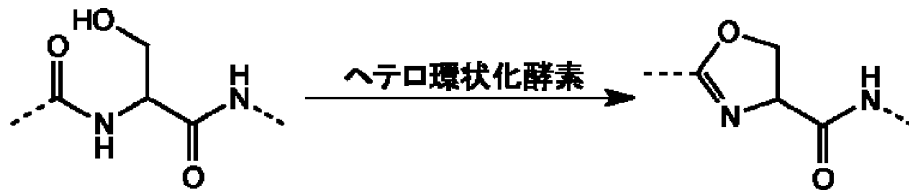


【0022】

Ser、Thr、Cys、2,3-ジアミノプロピオン酸にアゾリン骨格を導入すると、それぞれ以下のようなオキサゾリン、チアゾリン骨格、またはイミダゾリン骨格を生じる。

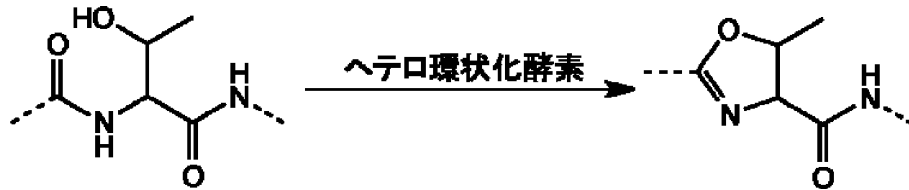
Ser:

【化 6】



Thr:

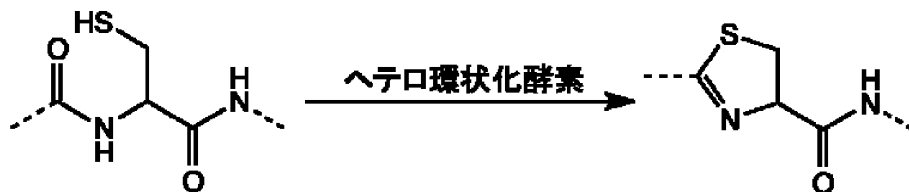
【化 7】



10

Cys:

【化 8】



20

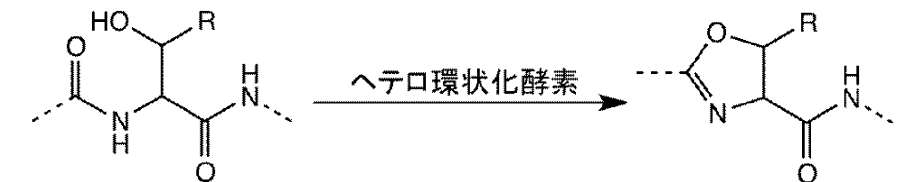
2,3-ジアミノプロピオン酸:

【化 9】



また、例えば、上述したThrのアナログ残基にアゾリン骨格を導入すると以下に示すオキサゾリン骨格を生じる。

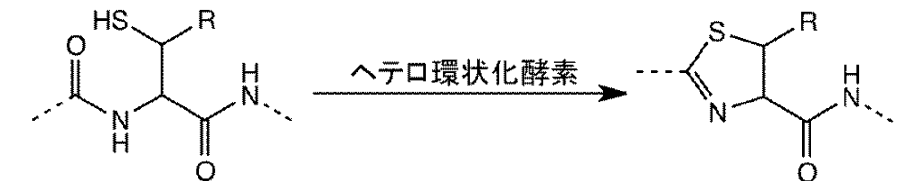
【化 10】



30

上述したCysのアナログ残基にアゾリン骨格を導入すると以下に示すイミダゾリン骨格を生じる。

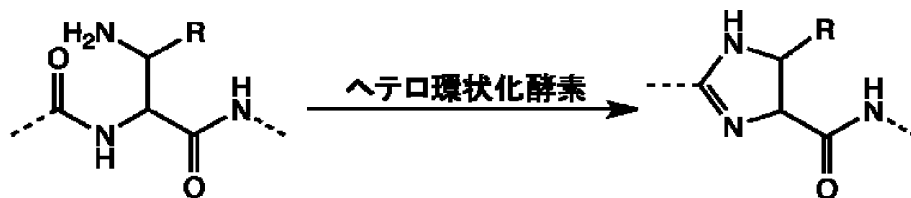
【化 11】



40

上述した2,3-ジアミノ酸のアナログ残基にアゾリン骨格を導入すると以下に示すチアゾリン骨格を生じる。

【化 1 2】



【 0 0 2 3 】

上記式 (I) において、 Xaa_0 は、少なくとも1つのCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログを含む限り、任意のアミノ酸を示す。上述のとおり、PatD等のアゾリン骨格導入酵素は、7又は8アミノ酸の所定の規則性を有するカセット領域しか修飾しないと考えられていたが、後述する実施例に示されるとおり、 m が2から40である幅広い配列が基質となりうる。

10

【 0 0 2 4 】

上記式 (I) において、 Xaa_1 は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示す。上述のとおり、従来、PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質となるペプチドにおいては、修飾される残基は並ぶことが少ないと考えられていたが、後述する実施例に示されるとおり、 Xaa_1 がCys、Ser又はThrであり、隣接する Xaa_2 と同一のアミノ酸であっても、式 (I) のペプチドは、アゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。

また、従来、PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質となるペプチドにおいては、Ser、Cys、Thr以外の残基は疎水性アミノ酸残基が多いと考えられていたが、後述する実施例に示されるとおり、 Xaa_1 が親水性アミノ酸であっても、アゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。

20

【 0 0 2 5 】

上記式 (I) において、 m は2以上の整数であり、16以下、18以下、20以下、30以下、又は40以下の整数である。また、 n は1以上の整数であり、8以下、9以下、10以下、又は20以下の整数でありうる。上述のとおり、従来、PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質となるのは、 $m=7$ 又は8、即ち $n=3$ 又は4であると考えられていたが、後述する実施例に示されるとおり、 m が9以上、 n が5以上であっても、式 (I) のペプチドはアゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。

【 0 0 2 6 】

上記式 (I) にいおて、A及びBは、それぞれ独立に0~100アミノ酸からなるペプチドを示す。Aは、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1の全部又は一部を含みうる。また、PatEのリーダー配列の全部又は一部、Hisタグ、リンカー等を含んでいてもよい。Bは、認識配列2の全部又は一部を含みうる。また、Hisタグ、リンカー等を含んでいてもよい。A及びBの長さは、例えば、100、70、60、50、40、30、20、10、5、2、0アミノ酸とすることができるがこれらに限定されない。また、A及びBは、1又は数個のアミノ酸が修飾アミノ酸やアミノ酸アナログであってもよい。

30

【 0 0 2 7 】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、N末端から順に、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ 、及びアゾリン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAライブラリーを製造する工程を含む。

40

【 0 0 2 8 】

アゾリン骨格導入酵素による認識配列1及び2は、0~10アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素による認識配列をいい、アゾリン骨格導入酵素がこれを認識して $-(Xaa_0)_m-$ にアゾリン骨格を導入する限り、どのような配列であってもよい。アゾリン骨格導入酵素がPatDである場合、認識配列1としては、例えば、G(A/L/V)(G/E/D)(A/P)(S/T/C) (配列番号：2) を用いることができ、例えば、GLEAS (配列番号：3) としてもよい。アゾリン骨格導入酵素による認識配列2としては、(A/S)Y(D/E)G(A/L/V) (配列番号：4) 含むものを用いることができる。例えば、かかる配列として、AYDGVPS (配列番号

50

: 5)、AYDGV(配列番号: 6)、AYDGVGSGSGS(配列番号: 7)、AYDGVGGGGG(配列番号: 8)、AYDGVGSGSGS(配列番号: 9)としてもよい。

後述する実施例に示すとおり、上記前駆体ペプチドは、認識配列1及び/又は2がなくてもアゾリン骨格導入酵素の基質となりうるので、認識配列1及び2は、前駆体ペプチドの任意の構成要素である。

さらに、後述する実施例に示すとおり、認識配列1及び2として、従来認識配列として知られる配列とはまったく関係のない配列を用いても、上記前駆体ペプチドはアゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。

特に、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ のN末端側の認識配列1は、存在したほうがアゾリン骨格導入酵素による修飾を受けやすいが、存在する限りその配列は特に限定されない。例えば、認識配列1としては、GGGGGやQQQQQやLLLLLやPPPPPなどの配列を用いてもよい。

【0029】

後述のとおり、上記前駆体ペプチドは、そのN末端側にリーダー配列を含むペプチドをさらに融合させてもよい。

リーダー配列、アゾリン環導入酵素による認識配列1、 $-(Xaa_0)_m-$ 、及びアゾリン環導入酵素による認識配列2は、前駆体ペプチドにおいて隣接していてもよく、前駆体ペプチドとして無細胞発現系で発現し、アゾリン環導入酵素による修飾を受ける限り、間に1から数個のアミノ酸配列を挟んでいてもよい。

【0030】

$-(Xaa_0)_m-$ をコードするmRNAのライブラリーは、例えば、 $-(NNN)_n-$ 、 $-(NNK)_n-$ 、 $-(NNU)_n-$ 、 $-(NNG)_n-$ 、などの配列を含むDNAを合成し、これを転写することによって作製することができる。ここで、NはA/C/G/Tのうち任意の一つ、KはG/Tのうち任意の一つを意味し、NNN及びNNKは20種類のタンパク質性アミノ酸のうちの任意の一つを、NNU及びNNGはそれぞれ15及び14種類のタンパク質性アミノ酸のうちの任意の一つをコードする。

$-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ をコードするmRNAのライブラリーは、例えば、 $-(NNK - WSU)_n-$ 、 $-(NNK - UGU)_n-$ などの配列を含むDNAを合成し、これを転写することによって作製することができる。ここで、NはA/C/G/Tのうち任意の一つ、KはG/Tのうち任意の一つ、WはA/Tのうち任意の一つ、SはC/Gのうち任意の一つを意味し、NNN及びNNKは20種類のタンパク質性アミノ酸のうちの任意の一つ、WSUはSer/Thr/Cysのうちの任意の一つ、UGUはCysをコードする。

このような構成とすることで、例えば、 $-(Xaa_0)_m-$ において、 $m=10$ の場合、天然のアミノ酸20種のみ使用することを想定しても、理論的に 20^{10} 種類の変異体を作製することができる。また、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ において $n=5$ の場合、 $20^5 \times 3^5$ 種類の変異体を作製することができるので、ライブラリーとしては十分なサイズとなる。

$-(Xaa_0)_m-$ をコードするDNAの5'末端に認識配列1をコードするDNAを含み、3'末端側に認識配列2をコードするDNAを含むDNAを合成し、これを転写することによって、認識配列1、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAを得ることができる。また、認識配列1をコードするDNAの5'末端側に、さらにリーダー配列をコードするDNAを含むDNAを合成し、これを転写することによって、リーダー配列、認識配列1、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNAを得ることができる。

【0031】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、上記mRNAライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により上記前駆体ペプチドを発現させ、ペプチドライブラリーを製造する工程を含む。

無細胞翻訳系は、例えば、リボソームタンパク質、アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)、リボソームRNA、アミノ酸、GTP、ATP、翻訳開始因子(IF)伸長因子(EF)、終結因子(RF)、およびリボソーム再生因子(RRF)、ならびに翻訳に必要なその他の因子を含む。発現効率を高くするために大腸菌抽出液や小麦胚芽抽出液を用いてもよい。他に、ウサギ赤血球

10

20

30

40

50

抽出液や昆虫細胞抽出液を用いてもよい。

これらを含む系に、透析を用いて連続的にエネルギーを供給することで、数百 μg から数 mg/mL の蛋白質を生産することができる。遺伝子DNAからの転写を併せて行うためにRNAポリメラーゼを含む系としてもよい。市販されている無細胞翻訳系として、大腸菌由来の系としてはロシュ・ダイアグノスティクス社のRTS-100（登録商標）、PGI社のPURESYSTEM（登録商標）等、小麦胚芽抽出液を用いた系としてはゾイジーン社やセルフリースサイエンス社のもの等を使用できる。

無細胞翻訳系によれば、発現産物を精製することなく、同じ容器に翻訳後修飾酵素を添加して、ワンポットでペプチドを修飾することができる。

【0032】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、アゾリン骨格導入酵素と、上記ペプチドライブラリーとを、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程を含む。より具体的には、Ser及びThrには、オキサゾリン骨格が、Cysにはチアゾリン骨格が、2,3-ジアミノ酸にはイミダゾリン骨格が導入される。

【0033】

リーダー配列は、アゾリン骨格導入酵素による修飾を受けやすくする配列であり、この目的を果たす限り、どのような配列であってもよい。後述する実施例に示されるとおり、リーダー配列が存在しなくても、認識配列1、 $-(\text{Xaa}_1 - \text{Xaa}_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドは、アゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。リーダー配列は、例えば、5アミノ酸、7アミノ酸、10アミノ酸、20アミノ酸、30アミノ酸、40アミノ酸、50アミノ酸程度とすることができる。

【0034】

リーダー配列としては、例えば、以下のアミノ酸配列、このアミノ酸配列の部分配列、又は、このアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、付加、若しくは置換されたアミノ酸配列からなるペプチドを用いることができる。

MNKKNI LPQQGQP VIRTAGQLSSQLAELSEEALGDA（配列番号：1）

配列番号：1のアミノ酸配列の部分配列としては、このアミノ酸の連続した4アミノ酸以上、5アミノ酸以上、または6アミノ酸以上の配列を含むものとする。配列番号：1のどこに位置する部分であるかは特に限定されないが、例えば、配列番号：1のアミノ酸配列のうちC末端の4アミノ酸、5アミノ酸、又は6アミノ酸を含むものとする。ことができる。

さらに、後述する実施例に示すとおり、リーダー配列として、従来リーダー配列として知られるPatEのリーダー配列とはまったく関係のない配列を用いても、上記前駆体ペプチドはアゾリン骨格導入酵素の基質となりうる。例えば、リーダー配列として、別のペプチド由来（Lacticin481前駆体）のMKEQNSFNLLQEVTESELDLILGAなどの配列や、ヒトアクチン由来のMILASLSTFQQMWISKQEYDEAGDAなどの配列、PatEのリーダー配列をシャッフルしたMELQLRPSGLEKKQAPISELNIAQTQGGDSQVLALNAなどの配列を用いてもよい。

リーダー配列として、ヘリシティ（alpha helicity）の高い配列を用いてもよい。

【0035】

本明細書において、「アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で」という場合、当該ペプチドは、反応系において、認識配列1、 $-(\text{Xaa}_1 - \text{Xaa}_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドとして存在してもよいし、認識配列1、 $-(\text{Xaa}_1 - \text{Xaa}_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドに融合していてもよい。

天然のPatDの基質においては、リーダー配列、認識配列1、カセット配列、及び認識配列2が融合しているが、後述する実施例に示すとおり、本発明者らは、認識配列1、 $-(\text{Xaa}_1 - \text{Xaa}_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドをアゾリン骨格導入酵素と反応させる際、リーダー配列を独立したペプチドとしてその反応系に加えても、当該前駆体ペプチ

10

20

30

40

50

ドがアゾリン骨格導入酵素の基質となりうることを見出した。

リーダー配列を、認識配列1、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドとすると、それぞれのペプチド（すなわちリーダー配列を含むペプチドと前駆体ペプチド）を短くすることができるので、調製が容易になる。リーダー配列も融合している場合、標的分子への結合の際に立体的な障害となる可能性があるため、スクリーニング先立って切断しておくことが望ましいが、もともと別個のペプチドとしておけば、切断する必要がない。

それぞれのペプチドは、翻訳合成によって調製してもよく、化学合成によって調製してもよい。

【0036】

アゾリン骨格導入酵素としては、PatD及びこれと相同性を有する酵素が挙げられる。PatDと相同性を有する酵素としては、例えば、Leeらの報告（Lee, S. W. et al., PNAS vol. 105, No.15, 5879-5884, 2008）に含まれるものを用いることができるがこれらに限定されない。

アゾリン骨格導入酵素は、アゾリン骨格導入酵素を産生する微生物から抽出・精製したものであっても、遺伝子組換え法によって発現させたものであってもよい。例えば、常法に従い、N末端にHisタグが付与されたコンストラクトとして大腸菌内で発現し、Hisタグを利用して精製することができる。アゾリン骨格導入酵素は、アゾリン骨格を導入する限り、その変異体であってもよい。

アゾリン骨格導入酵素とペプチドライブラリーとの反応は、上述した前駆体ペプチドを発現させたのと同じ容器内で、即ちワンポットで、前駆体ペプチドを精製することなく、アゾリン骨格導入酵素を添加して行うことができる。アゾリン骨格導入酵素とペプチドライブラリーとの反応は、例えば、アゾリン骨格導入酵素がPatDの場合、終濃度 $0.1\mu\text{M} \sim 80\mu\text{M}$ 、反応温度 $4 \sim 45^\circ\text{C}$ 、反応時間5分～100時間等の範囲において、当業者が適宜条件を選択して行うことができる。

反応の確認は、例えば、MALDI-TOF-MSを用いて質量変化を測定することにより行うことができる。

【0037】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様として、リーダー配列を、認識配列1、 $-(Xaa_1 - Xaa_2)_n-$ 、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドと融合させた場合には、当該前駆体ペプチドからリーダー配列を切断する工程を行ってもよい。これにより、 $-(Xaa_0)_m-$ で表されるカセット領域部分が、標的物質と結合しやすくなる。

リーダー配列の切断も、アゾリン骨格導入酵素の反応を行ったのと同じ容器内に、ペプチダーゼを加えることによって行うことができる。

リーダー配列の切断は、リーダー配列、認識配列1、リーダー配列と認識配列1の結合部位、認識配列1とカセット領域の結合部位、カセット領域と認識配列2との結合部位のいずれを切断して行ってもよく、切断する部位の配列に応じてペプチダーゼが選択される。ペプチダーゼとしては、トリプシン、Glu-C、Lys-C、Asp-N、Lys-N、Arg-C、トロンピン、Factor Xa、prescission protease、TEV protease、エンテロキナーゼ、HRV 3C Protease等が挙げられるがこれらに限定されない。

一例として、アゾリン骨格導入酵素の認識配列1をGLEASとする場合、エンドプロテイナーゼGlu-Cを用いて行うことができ、GluとAlaの間で切断することが可能である。Glu-Cの反応は、公知の方法に従って行うことができる。

【0038】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、アゾリン化合物と、前記式(I)で示されるペプチドをコードするmRNAとの複合体を2種以上含むアゾリン化合物ライブラリーを製造するものである。これにより、アゾリン化合物ライブラリーを、mRNAディスプレイ（Nemoto, N. et al., FEBS Lett. 1997, 405 - 408; Roberts, R.W. and Szostak, J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 12297 - 12302）に応用することができる。

このようなアゾリン化合物 - mRNA複合体ライブラリーを用いて、標的物質に結合するアゾリン化合物のスクリーニングを行えば、選択されたアゾリン化合物 - mRNA複合体に対し、逆転写反応を行ってcDNAを含む複合体を得て、その塩基配列を決定することができる。

アゾリン化合物 - mRNA複合体の作製は、例えば、公知の方法で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ライブラリーを作製し、このピューロマイシン結合mRNAライブラリーを用いて、無細胞翻訳系により前駆体ペプチドを発現させることにより行うことができる。

こうして、ペプチド - mRNA複合体ライブラリーを得た後、PatDと反応させ、必要に応じてリーダー配列を切断し、アゾリン化合物ライブラリーを得ることができる。

【0039】

10

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様においては、式(I)で示せるペプチドの少なくとも1つが、以下の(i)~(iv)の少なくとも1つの特徴を有する。

(i) mが2~40(但し、7及び8を除く)。mは、例えば、2、3、4、5、6、9、10、12、14、16、20、30、40である；

(ii) nが1~20(但し、3及び4を除く)。nは、例えば、1、2、5、6、7、8、10、15、20である；

(iii) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つが親水性アミノ酸である。

20

(i)~(iv)の特徴を有するペプチドは、従来PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質とはなり得ないと考えられていたものを含み、本発明者らが初めてアゾリン骨格導入酵素の基質となり得ることを確認したものである。

【0040】

今般、初めてアゾリン骨格導入酵素の基質となることが確認されたカセット配列として、以下のものが挙げられる。

【表 3】

変異体名	—(Xaa ₀) _m —	配列番号
C1m1	VTACIT	10
C1m2	VTACITFCVT	11
C1m3	VTATITFT	12
C1m4	VCACICFC	13
C1m5	VSASISFS	14
C1m6	VTADITFC	15
C1m7	VTANITFC	16
C1m8	VTAKITFC	17
C1m9	CFTICATV	18
C1m10	VTACITFCVTIC	19
C1m11	VTACDTFC	20
C1m12	VTACNTFC	21
C1m13	VTACKTFC	22
C1m14	VCACDCFC	23
C1m15	VCACNCFC	24
C1m16	VCACKCFC	25
C1m17	VCATITFT	26
C1m18	VTACITFT	27
C1m19	VTATICFT	28
C1m20	VTATITFC	29
C1m21	CFCICACV	30
C1m22	DTACITFC	31
C1m23	NTACITFC	32
C1m24	KTACITFC	33
C1m25	VTACETFC	34
C1m26	VTACQTFC	35
C1m27	VTACHTFC	36
C1m28	VTACRTFC	37
C1m29	VTACPTFC	38
C1m30	VFALIMFC	39
C1m31	VFALIMCC	40
C1m32	VFALICCC	41
C1m33	VCACRCFC	42
C1m34	RTACITFC	43
C1m35	VFALCCCC	44
C1m36	RCD CDCRC	45
C1m37	VCACICFCVCACVC	46
C1m38	VCACICFCVCACVCIC	47
C1m39	VTATDTFT	48
C1m40	VSASDSFS	49

10

20

30

40

【表 4】

C1m41	VTATITFTVTIT	50
C1m42	RCRCICFCVCACVC	51
C1m43	VCACICRCRCACVC	52
C1m44	VCACICFCVCRRC	53
C1m45	VTATICFC	54
C1m46	VCATITFC	55
C1m47	VCACITFT	56
C1m48	VCATICFT	57

10

【表 4 - 2】

変異体名	－(Xaa ₀)m－	配列番号
m049	VC	
m050	VCAC	
m051	VCACICFCVCACVCICYCFCIC	
m052	VCACICFCVCVCFVCYACACYCICFCACVCICYCFCIC	
m053	RTDTRT	
m054	RSDSDSRS	
m055	CCCCC	
m056	TTTTT	
m057	SSSSS	
m058	VFATITFT	
m059	CFATITFT	
m068	VFALCCCC	
m119	VT	
m196	VTAC	
m197	VTACITFCVTAC	
m198	VTACITFCVTACVSIC	
m199	VTACITFCVTACVSICYTFCIT	
m200	VTACITFCVTACVSICYTFCITFCATVCISYCFTIC	
m201	VTACITFCVTACVTIC	
m202	VTACITFCVTACVTICYTFCIT	
m203	VTACITFCVTACVTICYTFCITFCATVCITYCFTIC	

20

30

【0041】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様においては、アゾリン化合物の少なくとも1つが、アゾリン骨格を5以上有する。

従来、アゾリン骨格導入酵素を用いても、天然のPatEのカセット領域にアゾリン骨格は5以上導入されないものと考えられていた。アゾリン骨格を5以上有するアゾリン化合物は、本発明者らが初めて合成したものである。

【0042】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様においては、アゾリン化合物の少なくとも1つが、Ser/Thr/Cysから得られた通常のおキサゾリン/チアゾリン以外のアゾリン骨格を有する。

従来、アゾリン骨格導入酵素を用いても、天然のPatEのカセット領域に存在するSer/Th

40

50

r/Cys以外にはアゾリン骨格は導入されないものと考えられていた。Dap/tBuSer/iPrSer/PhSer/EtSerなどの非タンパク質性アミノ酸から誘導されたイミダゾリン骨格や置換型アゾリン骨格がPatD等のアゾリン骨格導入酵素によって導入された化合物は、本発明者らが初めて合成したものである。

【0043】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの製造方法の一態様では、リーダー配列の切断の前又は後に、アゾリン化合物を大環状化する工程を含む。アゾリン化合物の大環状化は、ペプチドを大環状化する公知の方法又はそれに準ずる方法を用いて行うことができ、例えば、国際公開第2008/117833号に開示された方法やTimmermanらの方法（Timmerman, P et al., ChemBioChem 2005, 6:821-824）に従って行うことができる。

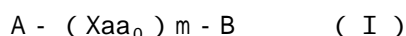
10

【0044】

（アゾール化合物ライブラリーの製造方法）

本発明はまた、2種以上のアゾール化合物を含むアゾール化合物ライブラリーの製造方法を提供する。本発明のアゾール化合物ライブラリーの製造方法において使用される用語のうち、上述したアゾリン化合物ライブラリーの製造方法においても使用される用語は、特に断りがない限り同義と解される。

本明細書において「アゾール化合物」とは、下記式（I）で示されるペプチドの、Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾール骨格が導入されている化合物をいう。



20

[式中、m個のXaa₀は、任意のアミノ酸を示すが、少なくとも1つはCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸であり、mは、2から20より選択される整数を示し、A及びBは、それぞれ独立に0から8アミノ酸からなるペプチドを示す。]

【0045】

本発明の一態様において、アゾール化合物は、式（I）における - (Xaa₀)_m - が、 - (Xaa₁ - Xaa₂)_n - である。

[式中、n個のXaa₁は、それぞれ独立に任意のアミノ酸を示し、n個のXaa₂は、それぞれ独立にCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログからなる群より選択されるアミノ酸を示し、nは、1から10より選択される整数を示す。]

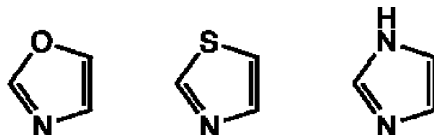
30

アゾール骨格が導入されたCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログは、Xaa₁の位置にあるものでも、Xaa₂の位置にあるものでもよい。

【0046】

本明細書において、「Cys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾール骨格が導入されている」とは、Cys、Ser、Thrの脱水反応によって生じたアゾリン環の酸化反応が振興し、下記式で示されるアゾール環が導入されることを意味する。

【化13】



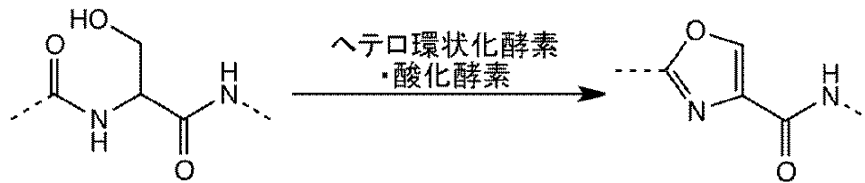
40

【0047】

Ser、Thr、Cys、2,3-ジアミノ酸にアゾール骨格を導入すると、それぞれ以下のようなオキサゾール又はチアゾール又はイミダゾール骨格を生じる。

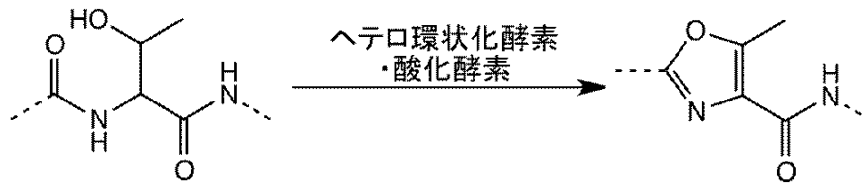
Ser :

【化14】



Thr :

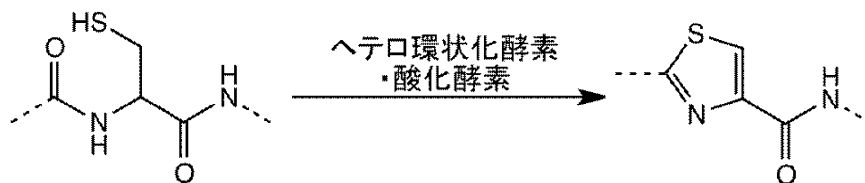
【化15】



10

Cys :

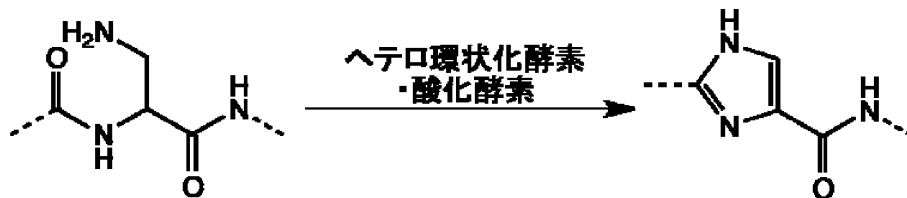
【化16】



20

Dap :

【化17】

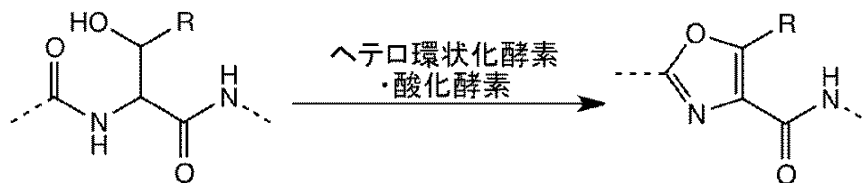


【0048】

例えば、上述したThrの人工アナログ残基にアゾール骨格を導入すると以下に示すオキサゾール骨格を生じる。

30

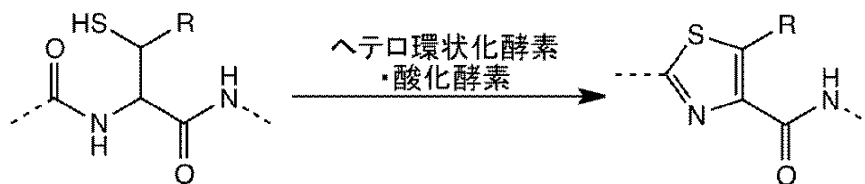
【化18】



【0049】

また、上述したCysの人工アナログ残基にアゾール骨格を導入すると以下に示すチアゾール骨格を生じる。

【化19】

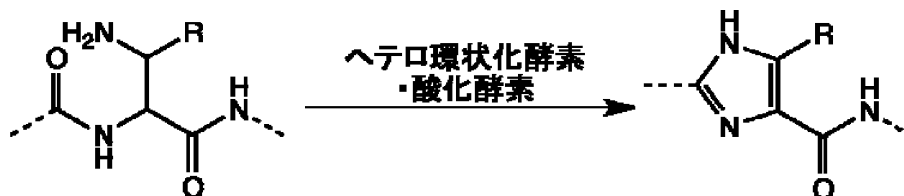


40

【0050】

また、上述したジアミノ酸の人工アナログ残基にアゾール骨格を導入すると以下に示すイミダゾール骨格を生じる。

【化 20】



【0051】

本発明のアゾール化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、上述したアゾリン化合物ライブラリーの製造方法において、アゾリン骨格を導入する工程の後、アゾリン骨格が導入されたライブラリーと、アゾール骨格導入酵素とを反応させ、アゾリン骨格の少なくとも1つをアゾール骨格に変換する工程を含む。Ser及びThrに導入されたオキサゾリン骨格はオキサゾール骨格に、Cysに導入されたチアゾリン骨格はチアゾール骨格に、2,3-ジアミノ酸に導入されたイミダゾリン骨格はイミダゾール骨格にそれぞれ変換される。アゾリン骨格が導入されたライブラリーと、アゾール骨格導入酵素とを反応させる工程は、アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で行ってもよい。アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドは、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドと同一であってもよいし、別のペプチドを用いてもよい。

アゾール骨格導入酵素としては、PatG及びこれと相同性を有する酵素が挙げられる。PatGと相同性を有する酵素としては、例えば、Leeらの報告 (Lee, S. W. et al., PNAS vol. 105, No. 15, 5879-5884, 2008) に含まれるものを用いることができるがこれらに限定されない。

アゾール骨格導入酵素との反応は、アゾリン骨格導入酵素による反応を行ったのと同じ容器内に、アゾール骨格導入酵素を添加することによって行うことができる。

【0052】

本発明のアゾール化合物ライブラリーの製造方法の一態様は、アゾール骨格導入酵素としてPatGのペプチダーゼドメインを欠損した変異体もしくは点変異によりペプチダーゼ活性を無くした変異体を用いる。PatGは、2つのドメインからなり、天然においては、N末端のオキシダーゼドメインがPatDで構築されたアゾリン骨格をアゾール骨格に変換し、C末端のペプチダーゼドメインが、修飾後のペプチド部位の切り出し、大環状化を行っている。従って、本発明のアゾール化合物ライブラリーの製造方法では、ペプチダーゼドメインを欠損した変異体もしくは点変異によりペプチダーゼ活性を無くした変異体を用いることができる。

【0053】

(アゾリン化合物ライブラリー)

本発明は、2種以上のアゾリン化合物ライブラリーも提供する。ここで使用される用語のうち、上述したライブラリーの製造方法においても使用される用語は、特に断りがない限り同義と解される。

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの一態様は、以下の(i)～(iv)の少なくとも1つの特徴を有するアゾリン化合物を少なくとも1種含む。

(i) mが2～20(但し、7及び8を除く)。mは、例えば、2、3、4、5、6、9、10、12、14、16、20、30、40であり得る；

(ii) nが1～10(但し、3及び4を除く)。nは、例えば、1、2、5、6、7、8、10、15、20であり得る；

(iii) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である；及び

(iv) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つが親水性アミノ酸である。

(i)～(vi)の特徴を有するペプチドは、従来PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質とはなり得ないと考えられていたものを含み、本発明者らが初めてアゾリン骨格導入酵素の基

10

20

30

40

50

質となり得ることを確認したものである。

【 0 0 5 4 】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの一態様は、アゾリン化合物のそれぞれが、そのペプチド部分をコードするmRNAとの複合体を形成している。mRNAディスプレイに応用可能なライブラリーである。

【 0 0 5 5 】

本発明のアゾリン化合物ライブラリーの一態様は、上記式 (I) で示されるペプチドのN末端及びC末端に、アゾリン骨格導入酵素の認識配列の全部または一部が結合している。

アゾリン骨格導入酵素の認識配列は、無細胞翻訳系で発現させたペプチドをアゾリン骨格導入酵素で修飾するために必要であり、本発明の方法でアゾリン化合物ライブラリーを作製し、ペプチダーゼでリーダー配列を切断する場合、N末端及びC末端にこれらの配列の全部又は一部が残存することがある。

例えば、認識配列1をGLEAS (配列番号 : 3) とし、リーダー配列をGlu - Cで切断する場合、カセット領域のN末端側には、Ala - Serが残る。

【 0 0 5 6 】

(アゾール化合物ライブラリー)

本発明は、2種以上のアゾール化合物ライブラリーも提供する。ここで使用される用語のうち、上述したライブラリーの製造方法においても使用される用語は、特に断りがない限り同義と解される。

【 0 0 5 7 】

本発明のアゾール化合物ライブラリーの一態様は、以下の (i) ~ (iv) の少なくとも1つの特徴を有するアゾリン化合物を少なくとも1種含む。

(i) mが2 ~ 20 (但し、7及び8を除く) 。mは、例えば、2、3、4、5、6、9、10、12、14、16、20、30、40である ;

(ii) nが1 ~ 10 (但し、3及び4を除く) 。nは、例えば、1、2、5、6、7、8、10、15、20である ;

(iii) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つがCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログから選択されるアミノ酸である ; 及び

(iv) Xaa₁の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、又は少なくとも5つが親水性アミノ酸である。

(i) ~ (iv) の特徴を有するペプチドは、従来PatD等のアゾリン骨格導入酵素の基質とはなり得ないと考えられていたものを含み、本発明者らが初めてアゾリン骨格導入酵素の基質となり得ることを確認したものである。従って、アゾリン骨格導入酵素によりアゾリン骨格が導入された後、アゾール骨格導入酵素による修飾を行ってアゾール骨格を導入できるものと理解される。

【 0 0 5 8 】

本発明のアゾール化合物ライブラリーの一態様は、アゾール化合物のそれぞれが、そのペプチド部分をコードするmRNAとの複合体を形成している。mRNAディスプレイに応用可能なライブラリーである。

【 0 0 5 9 】

本発明のアゾール化合物ライブラリーの一態様は、上記式 (I) で示されるペプチドのN末端及びC末端に、PatDの認識配列の全部または一部が結合している。

PatDの認識配列は、無細胞翻訳系で発現させたペプチドをPatDで修飾するために必要であり、本発明の方法でアゾール化合物ライブラリーを作製し、ペプチダーゼでリーダー配列を切断する場合、N末端及びC末端にこれらの配列の全部又は一部が残存することがある。

例えば、認識配列1をGLEASとし、リーダー配列をGlu - Cで切断する場合、カセット領域のN末端側には、Ala - Serが残る。

【 0 0 6 0 】

(アゾリン化合物のスクリーニング方法)

本発明は、標的物質に結合するアゾリン化合物を同定するスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の一態様は、本発明に係るアゾリン化合物ライブラリーの製造方法又は本発明に係るアゾリン化合物ライブラリーと、標的物質を接触させてインキュベートする工程を含む。

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、タンパク質等とすることができる。特に、本発明のライブラリーによれば、標的物質がプロテアーゼ活性を有する場合にも用いることができる。

標的物質は、例えば、固相担体に固定して、本発明のライブラリーと接触させることができる。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、金属性、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、PVDFメンブレン等が挙げられ、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。

標的物質と、ライブラリーは、適宜選択された緩衝液中で接触させ、pH、温度、時間等を調節して反応させる。

【0061】

本発明のスクリーニング方法の一態様は、標的物質と結合したアゾリン化合物を選択する工程をさらに含む。標的物質への結合は、例えば、ペプチドを検出可能に標識する公知の方法に従って標識しておき、上記接触工程の後、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アゾリン化合物を検出して行う。

検出可能な標識としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、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、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、エクオリン等の発光物質、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子が挙げられる。酵素の場合、酵素の基質を加えて発色させ、検出することもできる。また、ペプチド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。

【0062】

単に結合の有無又は程度を検出・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アゾリン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、医薬として有用なアゾリン化合物の同定も可能となる。

【0063】

アゾリン化合物ライブラリーが、アゾリン化合物 - mRNA複合体で構成される場合、上述の方法で、標的物質に結合するアゾリン化合物を選択した後、選択したアゾリン化合物のmRNAの塩基配列を解析する工程を行ってもよい。

mRNAの塩基配列の解析は、まず逆転写反応によってcDNAを合成し、該cDNAの塩基配列を解析することにより行うことができる。これにより、遺伝子型と表現型の関係を簡単に特定することができる。

また、逆転写反応の後、さらに転写を行い、再びmRNAライブラリーへと変換し、標的化合物を用いたスクリーニングを繰り返すことによって、標的物質に対する結合能の強いアゾリン化合物を濃縮することができる。

【0064】

(アゾール化合物のスクリーニング方法)

本発明は、標的物質に結合するアゾール化合物を同定するスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法の一態様は、本発明に係るアゾール化合物ライブラリーの製造方法又は本発明に係るアゾール化合物ライブラリーと、標的物質を接触させてインキュベートする工程を含む。

アゾール化合物のスクリーニング方法は、上述したアゾリン化合物のスクリーニング方法に準じて行うことができる。

【 0 0 6 5 】

(スクリーニング用キット)

本発明は、アゾリン化合物又はアゾール化合物のスクリーニング用キットを提供する。

本発明のスクリーニング用キットの一態様は、本発明に係る製造方法で製造されたアゾリン化合物ライブラリー若しくはアゾール化合物ライブラリー、又は、本発明に係るアゾリン化合物ライブラリー若しくはアゾール化合物ライブラリーを含む。本発明のスクリーニング用キットは、他に、標的物質とアゾリン化合物又はアゾール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む。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、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。

本発明のスクリーニング用キットにおいては、ライブラリーが、固相担体にアレイ状に固定されていてもよい。

【 0 0 6 6 】

(アゾリン化合物の製造方法)

本発明は、式(I)で表されるペプチドにおいて、Xaa₀のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格が導入されているアゾリン化合物の製造方法も提供する。

当該方法は、N末端から順に、アゾリン骨格導入酵素による認識配列1、- (Xaa₀)_m-、及びアゾリン骨格導入酵素による認識配列2を含む前駆体ペプチドをコードするmRNA製造する工程と(ここで、認識配列1及び2は、0~10アミノ酸からなるアゾリン骨格導入酵素による認識配列をいう。);

上記mRNAを用いて、無細胞翻訳系により前駆体ペプチドを発現させる工程と;

アゾリン骨格導入酵素と、前駆体ペプチドとを、アゾリン骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、Xaa₀のCys、Ser、Thr、2,3-ジアミノ酸、及びこれらのアナログの少なくとも1つにアゾリン骨格を導入する工程とを含む。

ここで、リーダー配列を含むペプチドと、認識配列1、- (Xaa₀)_m-、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとは別個のペプチドである。

本方法によれば、リーダー配列を含むペプチドと認識配列1、- (Xaa₀)_m-、及び認識配列2を含む前駆体ペプチドとを、それぞれより短いペプチドとすることができるので、調製するのが容易である。調製は化学合成、翻訳合成、これらの組合せ等によって行うことができる。また、スクリーニングに先立って、リーダー配列を切り離す必要もない。

したがって、本方法は、本発明のスクリーニング方法によって、標的物質に結合するアゾリン化合物が同定された後、当該アゾリン化合物を大量に調製する場合に特に有利である。

【 0 0 6 7 】

(アゾール化合物の製造方法)

本発明は、上述のアゾリン化合物の製造方法によって得られたアゾリン化合物を用いて、アゾール化合物を製造する方法も包含する。

当該方法は、アゾリン化合物と、アゾール骨格導入酵素とを、アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドの存在下で反応させ、アゾリン骨格の少なくとも1つをアゾール骨格に変換する工程を含む。

本方法によれば、リーダー配列を含むペプチドとアゾリン化合物とを、それぞれより短いペプチドとすることができるので、調製するのが容易である。調製は化学合成、翻訳合成、これらの組合せ等によって行うことができる。また、スクリーニングに先立って、リーダー配列を切り離す必要もない。

したがって、本方法は、本発明のスクリーニング方法によって、標的物質に結合するアゾール化合物が同定された後、当該アゾール化合物を大量に調製する場合に特に有利である。

【 0 0 6 8 】

(アゾリン化合物又はアゾール化合物の製造用キット)

本発明に係るアゾリン化合物とアゾール化合物の製造用キットは、上記方法でアゾリン化合物又はアゾール化合物を製造するので、アゾリン骨格導入酵素又はアゾール骨格導入酵素と、アゾール骨格導入酵素の基質のリーダー配列を含むペプチドとを含む。

当該キットは、その他必要な試薬や器具、取扱説明書等を含んでいてもよい。

【実施例】

【 0 0 6 9 】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例に何ら限定されない。

【 0 0 7 0 】

以下の実施例においてアゾリン化合物ライブラリーの合成スキームを図1に示す。

[1] PatDの発現・精製

pET16bのプラスミドにPatDの遺伝子を導入し、N末端に10xHisタグが付与されたコンストラクトのプラスミドを作製した。大腸菌BL21(DE3)pLysS株に形質転換し、30℃で培養した。O.D.が0.4に達した所でIPTG 0.1mMを添加し、大量発現を誘導した後、オーバーナイトで培養した。回収した菌体をLysis Buffer(1M NaCl, 10mM Imidazole, 50mM HEPES-Na(pH7.5))で懸濁した後、超音波で破碎した。フィルターで濾過したサンプルを、His-Trap HPカラムを用いて精製した。カラムはあらかじめ10CVのBuffer A(500mM NaCl, 25mM Imidazole, 50mM HEPES-Na(pH7.5))で平衡化し、サンプル注入後、Buffer B(500mM NaCl, 500mM Imidazole, 50mM HEPES-Na(pH7.5))濃度を徐々に上げることによって、サンプル中のタンパク質を分離し、純粋なPatDフラクションを得た。得たサンプルを、Amicon Ultra(Millipore) 30kDaを用いて約4倍に濃縮した。その後PD-10(GE Lifescience)を用いてStore Buffer(200mM NaCl, 25mM HEPES(pH7.5), 10% glycerol)にバッファ交換し、80℃で保存した。

【 0 0 7 1 】

[2] PatEプラスミド(pET16b)の構築

pET16bに、以下のPatE配列をサブクローニングした。

ATGAACAAGAAAAACATCCTGCCCAACAAGGTCAACCGGTTATCCGCTTAACCGCAGGACAGTTGAGCTCGCAACTCGCGCAACTGTCTGAAGAAGCACTGGGCGACGCGGGGTTGGAGGCAAGCGTTACGGCGTGTATCACGTTTTGTGCGTACGATGCGTTGAGCCATCTATTACGGTCTGCATTAGTGTCTGCGCCTATGATGGGGAGTAA (配列番号：58)

【 0 0 7 2 】

[3] 基質ペプチドのDNAの作製

[3 - 1] PatEpreの作製

PatEプラスミドを鋳型に、2回のPCRによりPatEpreのDNAを作製した。下線部は、認識配列1のGLEAS (配列番号：3)をコードするDNAである。配列番号：59の48位～153位がリーダー配列のコード領域である。

GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGAACAAGAAAAACATCCTGCCCAACAAGGTCAACCGGTTATCCGCTTAACCGCAGGACAGTTGAGCTCGCAACTCGCCGAAGTGTCTGAAGAAGCACTGGGCGACGCGGGTGTGGAGGCAAGC (配列番号：59)

PatEpreは、リーダー配列と認識配列(下線部)を含んだ以下のアミノ酸配列からなるペプチドをコードする。

MNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEAS

PatEpreのPCRに使用したプライマーを下表に示す。プライマーの配列は、後掲するプライマー一覧に示す。

【表5】

final product	1st F primer	1st R primer	2nd F primer	2nd R primer
PatEpre	pre-lon a	pre-lon c	pre-lon b	pre-lon c

【 0 0 7 3 】

10

20

30

40

50

[3 - 2] 基質ペプチドのDNAの作製

[3 - 2 - 1] 認識配列2がAYDGVEPSのもの

PatEpreを鋳型に、2回もしくは3回のPCRによりカセット領域に変異を有するmutantのDNAを作製した。得られたペプチドの配列は、以下のとおりである。

MNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEAS (XXX) AYDGVEPS

カセット領域に当たる (XXX) 内の配列および使用したプライマーを以下に示す。プライマーの配列は、後掲するプライマー一覧に示す。

【表 6】

mutant	(XXX)内アミノ酸配列	配列 番号	F primer	1st R primer	2nd R primer	3rd R primer
C1wt	VTACITFC	60	T7ex5	wt-a	wt-b	-
C1m1	VTACIT	10	T7ex5	m1-a	m1-b	-
C1m2	VTACITFCVT	11	T7ex5	m2-a	m2-b	-
C1m3	VTATITFT	12	T7ex5	m3-a	m3-b	-
C1m4	VCACICFC	13	T7ex5	m4-a	m4-b	-
C1m5	VSASISFS	14	T7ex5	m5-a	m5-b	-
C1m6	VTADITFC	15	T7ex5	m6-a	wt-b	-
C1m7	VTANITFC	16	T7ex5	m7-a	wt-b	-
C1m8	VTAKITFC	17	T7ex5	m8-a	wt-b	-
C1m9	CFTICATV	18	T7ex5	m9-a	m9-b	-
C1m10	VTACITFCVTIC	19	T7ex5	m10-a	m10-b	m10-c
C1m11	VTACDTCFC	20	T7ex5	m11-a	wt-b	-
C1m12	VTACNTFC	21	T7ex5	m12-a	wt-b	-
C1m13	VTACKTFC	22	T7ex5	m13-a	m13-b	-
C1m14	VCACDCFC	23	T7ex5	m14-a	m14-b	-
C1m15	VCACNCFC	24	T7ex5	m15-a	m15-b	-
C1m16	VCACKCFC	25	T7ex5	m16-a	m16-b	-
C1m17	VCATITFT	26	T7ex5	m17-a	m3-b	-
C1m18	VTACITFT	27	T7ex5	m18-a	m3-b	-
C1m19	VTATICFT	28	T7ex5	m19-a	m19-b	-
C1m20	VTATITFC	29	T7ex5	m20-a	wt-b	-
C1m21	CFCICACV	30	T7ex5	m21-a	m21-b	-
C1m22	DTACITFC	31	T7ex5	m22-a	wt-b	-
C1m23	NTACITFC	32	T7ex5	m23-a	wt-b	-
C1m24	KTACITFC	33	T7ex5	m24-a	wt-b	-
C1m25	VTACETFC	34	T7ex5	m25-a	m25-b	-
C1m26	VTACQTFC	35	T7ex5	m26-a	m26-b	-
C1m27	VTACHTFC	36	T7ex5	m27-a	wt-b	-
C1m28	VTACRTFC	37	T7ex5	m28-a	wt-b	-
C1m29	VTACPTFC	38	T7ex5	m29-a	m29-b	-
C1m30	VFALIMFC	39	T7ex5	m30-a	m30-b	-
C1m31	VFALIMCC	40	T7ex5	m31-a	m31-b	-
C1m32	VFALICCC	41	T7ex5	m32-a	m32-b	-
C1m33	VCACRCFC	42	T7ex5	m33-a	m33-b	-
C1m34	RTACITFC	43	T7ex5	m34-a	wt-b	-
C1m35	VFALCCCC	44	T7ex5	m35-a	m35-b	-
C1m36	RCD CDCRC	45	T7ex5	m36-a	m36-b	-
C1m37	VCACICFCVCACVC	46	T7ex5	m37-a	m37-b	m10-c
C1m38	VCACICFCVCACVCIC	47	T7ex5	m37-a	m38-b	m38-c

10

20

30

40

【表 7】

C1m39	VTATDTFT	48	T7ex5	m39-a	m3-b	-
C1m40	VSASDSFS	49	T7ex5	m40-a	m40-b	-
C1m41	VTATITFTVTIT	50	T7ex5	m41-a	m41-b	m10-c
C1m42	RCRCICFCVCACVC	51	T7ex5	m42-a	m37-b	m10-c
C1m43	VCACICRCRCACVC	52	T7ex5	m43-a	m43-b	m10-c
C1m44	VCACICFCVCRCRC	53	T7ex5	m44-a	m44-b	m10-c
C1m45	VTATICFC	54	T7ex5	m45-a	m45-b	-
C1m46	VCATITFC	55	T7ex5	m46-a	wt-b	-
C1m47	VCACITFT	56	T7ex5	m47-a	m3-b	-
C1m48	VCATICFT	57	T7ex5	m48-a	m19-b	-

10

【表 7 - 2】

mutant	(XXX)内アミノ酸配列	配列 番号	F primer	1st R primer	2nd R primer	3rd R primer	4th R primer
m049	VC		T7ex5.F22	m49	m10-c	-	-
m050	VCAC		T7ex5.F22	m50	m10-c	-	-
m051	VCACICFCVCACVCICCYCFCIC		T7ex5.F22	m51-a	m51-b	-	-
m052	VCACICFCVCVCFCYCACYCICFCA CVCICCYCFCIC		T7ex5.F22	m52-a	m52-b	m51-b	-
m053	RTDTRT		T7ex5.F22	m53-a	m53-b	-	-
m054	RSDSRS		T7ex5.F22	m54-a	m54-b	-	-
m055	CCCCC		T7ex5.F22	m55	m35-N-b	-	-
m056	TTTTT		T7ex5.F22	m56	m1-b	-	-
m057	SSSSS		T7ex5.F22	m57-c	m57-d	-	-
m058	VFATITFT		T7ex5.F22	m58	m3-b	-	-
m059	CFATITFT		T7ex5.F22	m59	m3-b	-	-
m068	VFALCCCG		T7ex5.F22	m68	m10-c	-	-
m119	VT		T7ex5.F22	m119	m10-c	-	-
m196	VTAC		T7ex5.F22	m196	m10-c	-	-
m197	VTACITFCVTAC		T7ex5.F22	m197	m10-c	-	-
m198	VTACITFCVTACVSIC		T7ex5.F22	m198-a	m198-b	m10-c	-
m199	VTACITFCVTACVSICYTFCIT		T7ex5.F22	m199-a	m199-b	m10-c	-
m200	VTACITFCVTACVSICYTFCITFCAT VCISYCFITC		T7ex5.F22	m199-a	m200-a	m200-b	m10-c
m201	VTACITFCVTACVTIC		T7ex5.F22	m198-a	m201	m10-c	-
m202	VTACITFCVTACVTICYTFCIT		T7ex5.F22	m202-a	m202-b	m10-c	-
m203	VTACITFCVTACVTICYTFCITFCAT VCITYCFITC		T7ex5.F22	m202-a	m203-a	m203-b	m10-c

20

30

40

【 0 0 7 4 】

[3 - 2 - 2] 認識配列2がAYDGVEPS (配列番号: 5) 以外のペプチド

同様に、PatEpre2を鋳型として2、3回のPCRを行い、C末配列がAYDGVEPS以外となるペプチドのDNAも調製した。

MNKKNI LPQQGQPV IRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEAS (XXX) (YYY)

(XXX) はカセット領域、(YYY) は認識配列2を示す。

【表 8】

	(XXX)配列	配列番号	(YYY)配列	配列番号
wt-dgv	VTACITFC	60	AYDGV	6
m3-dgv	VTATITFT	12	AYDGV	6
m5-dgv	VSASISFS	14	AYDGV	6
m11-dgv	VTACDTFC	20	AYDGV	6
m12-dgv	VTACNTFC	21	AYDGV	6
m13-dgv	VTACKTFC	22	AYDGV	6
m31-dgv	VFALIMCC	40	AYDGV	6
m32-dgv	VFALICCC	41	AYDGV	6
wt-GS	VTACITFC	60	AYDGVGSGSGS	7
m3-GS	VTATITFT	12	AYDGVGSGSGS	7
m4-GS	VCACICFC	13	AYDGVGSGSGS	7
m5-GS	VSASISFS	14	AYDGVGSGSGS	7
m11-GS	VTACDTFC	20	AYDGVGSGSGS	7
m12-GS	VTACNTFC	21	AYDGVGSGSGS	7
m13-GS	VTACKTFC	22	AYDGVGSGSGS	7
m20-GS	VTATITFC	29	AYDGVGSGSGS	7
m32-GS	VFALICCC	41	AYDGVGSGSGS	7
m3-GG	VTATITFT	12	AYDGVGGGGGG	8
m5-GG	VSASISFS	14	AYDGVGGGGGG	8
m11-GG	VTACDTFC	20	AYDGVGGGGGG	8
m12-GG	VTACNTFC	21	AYDGVGGGGGG	8
m13-GG	VTACKTFC	22	AYDGVGGGGGG	8
m32-GG	VFALICCC	41	AYDGVGGGGGG	8
wt-EGS	VTACITFC	60	AYDGVGSGSGS	9
m11-EGS	VTACDTFC	20	AYDGVGSGSGS	9

10

20

30

使用したプライマーを以下に示す。プライマーの配列は、後掲するプライマー一覧に示す。

【表 9】

	F primer	1st R primer	2nd R primer	3rd R primer
wt-dgv	T7ex5	wt-a	wt-aydgv	-
m3-dgv	T7ex5	m3-a	m3-b	mT-aydgv
m5-dgv	T7ex5	m5-a	m5-b	mS-aydgv
m11-dgv	T7ex5	m11-a	m11-b	mC-aydgv
m12-dgv	T7ex5	m12-a	m12-b	mC-aydgv
m13-dgv	T7ex5	m13-a	m13-b	mC-aydgv
m31-dgv	T7ex5	m31-a	m31-b	mC-aydgv
m32-dgv	T7ex5	m32-a	m32-b	mC-aydgv
wt-GS	T7ex5	wt-a	wt-aydgv	wt-GS
m3-GS	T7ex5	m3-a	m3-b	mT-GS
m4-GS	T7ex5	m4-a	m4-b	wt-GS
m5-GS	T7ex5	m5-a	m5-b	mS-GS
m11-GS	T7ex5	m11-a	m11-b	wt-GS
m12-GS	T7ex5	m12-a	m12-b	wt-GS
m13-GS	T7ex5	m13-a	m13-b	wt-GS
m20-GS	T7ex5	m20-a	m20-b	wt-GS
m32-GS	T7ex5	m32-a	m32-b	wt-GS
m3-GG	T7ex5	m3-a	m3-b	mT-GG
m5-GG	T7ex5	m5-a	m5-b	mCS-GG
m11-GG	T7ex5	m11-a	m11-b	mCS-GG
m12-GG	T7ex5	m12-a	m12-b	mCS-GG
m13-GG	T7ex5	m13-a	m13-b	mCS-GG
m32-GG	T7ex5	m32-a	m32-b	mCS-GG
wt-EGS	T7ex5	wt-a	wt-EGS1	GS3an2
m11-EGS	T7ex5	m11-a	wt-EGS1	GS3an2

10

20

30

【 0 0 7 5 】

[4] PatD酵素反応

3 - 2 で調製したDNAを、Kawakamiらの方法 (Kawakami et al., Chemistry & Biology 15, 32-42 (2008)) に従って2.5 μ lスケールの無細胞タンパク質発現系で転写・翻訳した後、40mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM DTT, 4mM MgCl₂, 0.8mM ATP (それぞれ終濃度) を加えて溶液条件を整えた後、リコンビナントPatDを加えた。

下記のような2条件で反応を行った。

【表 1 0】

	A	B
PatD 終濃度 [μ M]	0.6	6
反応温度 [°C]	34	25
反応時間 [h]	2	16

40

【 0 0 7 6 】

[5] MALDI-TOF-MSによるペプチドの質量測定

MatrixとしてSinapinic Acidを用いて、MALDI-TOF-MSによってペプチドの質量を測定し、PatD添加による質量変化の有無を確認した。質量変化により、導入されたアゾリン環の個数がわかる。

カセット領域のアミノ酸配列が野生型PatEと同じであるC1wtをPatDで修飾したときの質

50

量分析の結果を図2に示す。この結果、4つのアゾリン環形成を示す分子量変化が見られた。

また、カセット領域が12アミノ酸（式（I）において $n=6$ ）であるC1m10、及び16アミノ酸（式（I）において $n=8$ ）であるC1m38の結果を図3に示す。C1m10は6つ、C1m38は8つのアゾリン環が導入されていることが確認された。

その他の代表的な結果を図4に示す。図4に示されるとおり、従来はPatDの基質になると考えられていなかったようなCys、Ser、Thr以外に親水性残基が存在する場合にも、PatDによる修飾を受けることが確認された。

このような実験の結果確認されたPatDの基質許容性を図5に示す。図示されるとおり、これまでにPatDの基質になると考えられていなかった配列を含む、多様な配列がPatDにより修飾を受けることが確認され、PatDは、アゾリン化合物ライブラリー合成に十分な基質許容性を有することがわかった。

【0077】

[6] Glu-C酵素反応

PatD酵素反応後、5.0 μ lの反応液に対してGlu-C（Roche）0.5 μ gを添加、25℃で2時間インキュベートし、ペプチドを切断した。このような実験の結果得られたリーダー配列の切断された修飾ペプチドの質量分析を図6に示す。

【0078】

[7] Glu-C酵素反応後の質量測定

Matrixとして -CHCAを用いて、MALDI-TOF-MSによってペプチドの質量を測定し、リーダー配列が切断されたペプチドを確認した。

結果の一例を図6に示す。リーダー配列が切断されたペプチドの形成が確認された。

【0079】

[8] ライブラリーの合成

ライブラリー構築に適した非翻訳領域を持つPatEpre2のDNAを調製した。下線部は、認識配列1のGLEAS（配列番号：3）をコードするDNAである。配列番号：61の46位～151位がリーダー配列のコード領域である。

TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAGAAAAACATCCTGCCCAACAAGGTCA
ACCGGTTATCCGCTTAACCGCAGGACAGTTGAGCTCGCAACTCGCCGAAGTGTCTGAAGAAGCACTGGGCGACGCGGGT
TGGAGGCAAGC（配列番号：61）

PatEpre2を鋳型に、ランダム塩基を含むプライマーを用いて、2回もしくは3回のPCRにより、下記のような2種類のライブラリーを作製した。

【0080】

[8-1] (XC)nライブラリー

下記の配列を有する二本鎖DNAを調製した。（ $n=3-8$ ）

TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAGAAAAACATCCTGCCCAACAAGGTCA
ACCGGTTATCCGCTTAACCGCAGGACAGTTGAGCTCGCAACTCGCCGAAGTGTCTGAAGAAGCACTGGGCGACGCGGGT
TGGAGGCAAGC(NNKTGT)nGCGTACGATGGCGTTGGT（配列番号：62）

このDNAを翻訳合成すると、以下のようなペプチドが合成される。

MNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEAS(XC)nAYDGVGSGSGS（配列番号：63）

【0081】

[8-2] (X-C/S/T)nライブラリー

下記の配列を有する二本鎖DNAを調製した。（ $n=3-6$ ）

TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAACAAGAAAAACATCCTGCCCAACAAGGTCA
ACCGGTTATCCGCTTAACCGCAGGACAGTTGAGCTCGCAACTCGCCGAAGTGTCTGAAGAAGCACTGGGCGACGCGGGT
TGGAGGCAAGC(NNKTGT)nGCGTACGATGGCGTTGGT（配列番号：64）

このDNAを翻訳合成すると、以下のようなペプチドが合成される。

MNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDAGLEA(X C/S/T)nAYDGVGSGSGS（配列番号：65）

それぞれのライブラリー構築に用いたプライマーの種類を下に示す。プライマーの配列は、後掲するプライマー一覧に示す。

【表 1 1】

library	F primer	1st R primer	2nd R primer
XC3	T7g10M	XC3pool	PatEpool.ex
XC4	T7g10M	XC4pool	PatEpool.ex
XC5	T7g10M	XC5pool	PatEpool.ex
XC6	T7g10M	XC6pool	PatEpool.ex
XC7	T7g10M	XC7pool	PatEpool.ex
XC8	T7g10M	XC8pool	PatEpool.ex
XCST3	T7g10M	XCST3pool	PatEpool.ex
XCST4	T7g10M	XCST4pool	PatEpool.ex
XCST5	T7g10M	XCST5pool	PatEpool.ex
XCST6	T7g10M	XCST6pool	PatEpool.ex

10

【 0 0 8 2 】

【 9 】 リーダー配列についての検討 (1)

リーダー配列の要否を検討するために、上記【 1 】～【 8 】と同様の方法で、基質ペプチドからリーダー配列を除いた場合と、リーダー配列を基質ペプチドとは別個のペプチドとして翻訳合成して反応系に加えた場合、及び化学合成したリーダー配列を終濃度1 μM 、10 μM 、50 μM になるように加えた場合とについて実験した。カセット配列は、8アミノ酸 (VTACITFC) とした。

20

結果を図 7 に示す。リーダー配列が基質ペプチドに融合していると酵素による修飾効率は高くなるものの、リーダー配列がなくても1分子の脱水は見られ、酵素の基質となるためにリーダー配列は必須ではないことがわかった。また、リーダー配列が反応系に存在していれば、基質ペプチドと融合していなくても4分子の脱水が見られ、基質ペプチドは十分に修飾されることが確認された。このことは、リーダー配列が基質の選択に必要なのではなく、リーダー配列の構造が酵素の活性化に寄与し、反応効率に影響を与えていることを示唆する。

【 0 0 8 3 】

30

【 1 0 】 リーダー配列についての検討 (2)

上記【 1 】～【 8 】と同様の方法で、図 8 及び図 1 9 に示されるようにリーダー配列の一部を欠失させ、PatDによる酵素活性を確認した。

図 8 及び図 1 9 に示されるとおり、PatDによる修飾を受けるために、全長のリーダー配列は必須ではないことがわかった。また、C末端側の配列がPatDによる修飾に重要であり、リーダー配列のC末端を含んでいれば、例えば、6アミノ酸程度でもPatDによる修飾を十分に受けることが確認された。

【 0 0 8 4 】

【 1 1 】 リーダー配列についての検討 (3)

上記【 1 】～【 8 】と同様の方法で、図 1 8 に示されるようにリーダー配列の全体を全く別のペプチド配列に置換し、PatDによる酵素活性を確認した。

40

図 1 8 に示されるとおり、PatDによる修飾を受けるために存在が必要なリーダー配列は、PatEのリーダー配列に制限されず、例えばヒトActinの部分配列や、Lactacin481の前駆体ペプチドのリーダー配列、PatEのリーダー配列をシャッフルした配列などであってもよいことが確認された。

【 0 0 8 5 】

【 1 2 】 リーダー配列についての検討 (4)

上記【 1 】～【 8 】と同様の方法で、図 2 0 に示されるようにリーダー配列の一部アミノ酸に点変異を導入し、PatDによる酵素活性を確認した。

図 2 0 に示されるとおり、PatDによる修飾を受けるために、PatEのリーダー配列におい

50

ては、28番目のGlu、29番目のLeu、31番目のGlu、32番目のGlu、34番目のLeuがPatDによる修飾に重要であることが確認された。

【0086】

[13] 認識配列についての検討

上記[1]～[8]と同様の方法で、図9及び図21に示されるように認識配列を欠失させた場合や、配列を変えた場合、配列を追加した場合について、PatDによる酵素活性を検討した。

図9及び図21に示されるとおり、認識配列2が存在しなくても、基質ペプチドは4分子の脱水を受けた。認識配列1を除くと、2分子の脱水しか生じなかったが、認識配列1も酵素活性に必須ではないことが確認された。また、認識配列をGGGGGやQQQQQやLLLLLやPPPPPに変更しても十分に修飾(4分子の脱水)を受けた。さらに、リーダー配列と認識配列の間にGGGGGを挿入した場合、認識配列とカセット配列の間にGGGGGを挿入した場合でも十分に修飾(4分子以上の脱水)を受けた。認識配列2の下流に追加の配列を付加した場合でも十分に修飾を受けた。

これらの結果から、認識配列1が存在したほうがPatDによる修飾効率は高くなるが、その配列は特に限定されず、認識配列2の存否はPatDによる修飾効率にほとんど影響しないことが示唆された。また、認識配列2の下流に配列を付加しても修飾効率にほとんど影響しないことも示唆された。

【0087】

[14] カセット配列に非天然型アミノ酸を含む基質に対するPatDの修飾効率の検討

図10Aに示すとおり、カセット配列に非天然型アミノ酸を含む基質を翻訳合成し、PatDによる修飾を行った。用いたアミノ酸を図10Bに示す。代表的な結果を図11に示す。図11に示されるとおり、従来はPatDの基質になると考えられていなかったようなThrの異性体、置換型のSer、ジアミノ酸などもPatDによる修飾を受け、対応するアゾリン環骨格に変換されることが確認された。

【0088】

[15] その他の基質についての検討

以下の配列を有する基質をそれぞれ合成し、PatDによる修飾を確認した。結果を下表に示す。代表的な結果を図16及び図17に示す。

10

20

【表 1 1 - 2】

リーダー配列	認識配列 1	カセット配列	認識配列 2	脱水された分子数
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	LCGCTSYCYTVS	AYDGVGSGSGS	2 to 4
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	SCNSISMSSTPS	AYDGVGSGSGS	3 to 5
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	CTLSNTPSSTLT	AYDGVGSGSGS	3 to 5
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	LSLSNTFTESES	AYDGVGSGSGS	1 to 3
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	SSLCITPSSTQT	AYDGVGSGSGS	2 to 5
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	LCGCTSYCYTVS	AYDGV	2
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	SCNSISMSSTPS	AYDGV	2 to 4
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	SSLCITPSSTQT	AYDGV	2 to 4
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAX (X=iPrSer)	AYDGVEPS	1 or 2
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAX (X=PhSer)	AYDGVEPS	1 or 2
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAXIXFX (X=iPrSer)	AYDGVEPS	1 to 4
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAXIXFX (X=PhSer)	AYDGVEPS	1 to 4
fMLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAX (X=Dap)	A	1 or 2
fMLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAX (X=PhSer)	A	1 or 2
fMLAELSEEALGDA	GGGGG	VXAX (X=Dap)	A	1
fMLAELSEEALGDA	GGGGG	VXAX (X=PhSer)	A	1
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAX (X=Dap)	AYDGVEPS	2
fMNKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEEALGDA	GLEAS	VXAXIXFX (X=Dap)	AYDGVEPS	3 or 4
Ac-LAELSEEALGDA	GLEAS	VXAXIXFX (X=Dap)	A	3 or 4
Ac-LAELSEEALGDA	GGGGG	VXAXIXFX (X=Dap)	A	4

【 0 0 8 9 】

[1 6] mRNAディスプレイ法を用いたスクリーニング

上述の方法で得られたアゾリン化合物ライブラリーを用いて、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase; MMP) 12に結合する化合物をmRNAディスプレイ法を用いてスクリーニングした。

【 0 0 9 0 】

[1 6 - 1] MMP12の精製

MMP12はC末端に6xHisタグとAviタグが付与されたコンストラクトとして大腸菌内で発現した。精製はHisタグを利用して行った。

また、Aviタグは同じプラスミドに組み込まれているbirAが発現するBirAによってビオチン化されるため、mRNAディスプレイの際にMMP12をストレプトアビジンビーズで固定化するために付与した。

【 0 0 9 1 】

[1 6 - 2] mRNAライブラリーの作製

[8] で得られたDNAライブラリーをT7 RNAポリメラーゼを用いて転写することで対応するmRNAを得た。

【 0 0 9 2 】

[1 6 - 3] mRNAディスプレイ

以下の「ピューロマイシンリンカーとの連結」から「回収したペプチドの配列情報の増幅」までのサイクルを繰り返し、アゾリン含有化合物ライブラリーからMMP12に結合するペプチドを選択した。

[1 6 - 3 - 1]ピューロマイシンリンカーとの連結

下記の配列で表されるピューロマイシンリンカーを上記の mRNA ライブラリーとアニールさせ、T4 RNA ligase で連結した。(SPC18 はCと0の総数が18であるPEGを表す。)

pdCTCCCGCCCCCGTCC(SPC18)₅CC(Pu)

[1 6 - 3 - 2] 翻訳

ピューロマイシンリンカーの連結されたmRNAライブラリーを翻訳し、ペプチドライブラリーを合成した。合成されたペプチドのC末端にピューロマイシンが結合することで、mRNAとペプチドが連結される。

[1 6 - 3 - 3] PatDによる翻訳

mRNAによってタグ付けされたペプチドライブラリーをPatDにより翻訳後修飾し、カセット配列内にアゾリン環を導入した。

[1 6 - 3 - 4] 逆転写

ペプチドと結合しているmRNAを逆転写し、アゾリン修飾ペプチド-mRNA-DNA複合体を合成した。

[1 6 - 3 - 5] プロテアーゼGlu-Cによる切断

Glu-Cを加え、リーダー配列を切断した。

[1 6 - 3 - 6] MMP12に結合するアゾリン修飾ペプチドの取得

ストレプトアビジンビーズに固定化したMMP12に、調製したアゾリン含有化合物ライブラリーを混合し、4 °Cで30分インキュベートした。上澄みを除去し、残ったビーズをバッファーで洗浄した。ビーズにPCR用の溶液を加えて95 °Cで5分間加熱し、ペプチドをビーズからはがして上澄みを回収した。

[1 6 - 3 - 7] 回収したアゾリン修飾ペプチドの配列情報の増幅

MMP12に結合して回収されてきたアゾリン修飾ペプチド-mRNA-DNA複合体に含まれるDNAを、PCRによって増幅した。得られたDNAを転写してmRNAとした。

[1 6 - 3 - 8] 選択されたアゾリン含有化合物配列の同定

上記の一連の操作を繰り返し、DNAの回収率に変化が見られなくなったところで増幅されたDNAを用いてTAクローニングを行い、得られたアゾリン含有化合物の配列を同定した。

[1 6 - 3 - 9] 選択されたアゾリン含有化合物の結合能力評価

mRNAディスプレイのスキームに従って、ただしmRNAライブラリーからではなく選択されたペプチドのmRNAから一連の操作を行い、選択されたアゾリン含有化合物がMMP12が結合したビーズに結合するかどうか調べた。また、PatDによる翻訳後修飾を行う条件と行わない条件で操作を行った。その結果、得られた配列についてPatDによる修飾がある時のみMMP12に結合し、それらの配列においてアゾリン骨格がMMP12への結合に寄与していることが示唆された。

【 0 0 9 3 】

mRNAディスプレイ法のイメージを図 1 2 に示す。

セレクションの結果を図 1 3 に示す。

セレクションの結果選択された5種類のアゾリン含有化合物A~Eについて配列を解析し(データ示さず)、MMP12に対する結合能力を評価した結果を図 1 4 に示す。

【 0 0 9 4 】

以下に使用したプライマーの塩基配列一覧を示す。

10

20

30

【表 1 2】

primer	塩基配列	配列番号
T7ex5	GGCGTAATACGACTCACTATAG	66
wt-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	67
wt-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACGTG	68
m1-a	CGCCATCGTACGCCGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	69
m1-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCCGTG	70
m2-a	CGCGGTAACACAAAAACGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	71
m2-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCCGTAACACAAAAACGTG	72
m3-a	ATCGTACGCCGTAAACGTGATGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	73
m3-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCCGTAAACGTG	74
m4-a	TCGTACGCACAAAAACAGATACACGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	75
m4-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACAGATAC	76
m5-a	ATCGTACGCAGAAAAAGAGATAGACGCAGAAACGCTTGCCTCCAACCCC	77
m5-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAGAAAAAGAGATAG	78
m6-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATGTCCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	79
m7-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATATTGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	80
m8-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATCTTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	81
m9-a	ATCGTACGCAACGGTTGCACAAATGGTAAACAGCTTGCCTCCAACCCC	82
m9-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAACGGTTGC	83
m10-a	AACACAAAAACGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	84
m10-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAATGGTAACACAAAAACGTGATACACGC	85
m10-c	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGC	86
m11-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGTACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	87
m12-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGTTACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	88
m13-a	CGTACGCACAAAAACGTCTTACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	89
m13-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACGTCTTAC	90
m14-a	ATCGTACGCACAAAAACAGTCACACGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	91
m14-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACAGTC	92
m15-a	CGTACGCACAAAAACAATTACACGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	93
m15-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACAATTACAC	94
m16-a	TCGTACGCACAAAAACACTTACACGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	95
m16-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACACTTAC	96
m17-a	ATCGTACGCCGTAAACGTGATGGTCGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	97
m18-a	ATCGTACGCCGTAAACGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	98
m19-a	CGTACGCCGTAAACAGATGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	99
m19-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCCGTAAACAGATG	100
m20-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	101
m21-a	CGTACGCAACACATGCACAAATACAAAAACAGCTTGCCTCCAACCCC	102
m21-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAACACATGCAC	103
m22-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATACACGCCGTGTCGCTTGCCTCCAACCCC	104
m23-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATACACGCCGATTGCTTGCCTCCAACCCC	105
m24-a	ATCGTACGCACAAAAACGTGATACACGCCGCTTGCTTGCCTCCAACCCC	106
m25-a	GTACGCACAAAAACGTTTACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	107
m25-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACGTTTAC	108
m26-a	GTACGCACAAAAACGTTTACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	109
m26-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAACGTTTAC	110

10

20

30

40

【表 1 3】

m27-a	ATCGTACGCACAAAACGTGTGACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	111
m28-a	ATCGTACGCACAAAACGTGCGACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	112
m29-a	GTACGCACAAAACGTCGGACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	113
m29-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAACGTGCG	114
m30-a	ATCGTACGCACAAAACATGATCAGCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	115
m30-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAACATGATC	116
m31-a	CGTACGCACAACACATGATCAGCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	117
m31-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAACACATGATC	118
m32-a	CGTACGCACAACAACAGATCAGCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	119
m32-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAACAACAGATC	120
m33-a	ATCGTACGCACAAAACAACGACACGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	121
m33-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAACAACG	122
m34-a	ATCGTACGCACAAAACGTGATACACGCCGTACGGCTTGCCTCCAACCCC	123
m35-a	CGTACGCACAACAACAACACAGCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	124
m35-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAACAACAACAC	125
m36-a	ATCGTACGCACAACGACAGTCACAGTCACAACGGCTTGCCTCCAACCCC	126
m36-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAACGACAG	127
m37-a	CGCACAACAACAAAACAGATACACGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	128
m37-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAAACACACGCACAAAACACAAAACAGAT	129
m38-b	CGCCATCGTACGCACAGATACAAAACACACGCACAAAACACAAAACAGAT	130
m38-c	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAG	131
m39-a	ATCGTACGCGGTAAACGTGTGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	132
m40-a	CGTACGCAGAAAAAGAGTCAGACGCAGAAACGCTTGCCTCCAACCCC	133
m40-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAGAAAAAGAGTCAG	134
m41-a	CGGTAAACGTGATGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	135
m41-b	TCAACGCCATCGTACGCGGTAAATGGTAACGGTAAACGTGATGGTCG	136
m42-a	CGCACAACAACAAAACAGATACAACGACAACGGCTTGCCTCCAACCCC	137
m43-a	CACAACGACAACGACAGATACACGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	138
m43-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAAACACACGCACAACGACAACGACAGATAC	139
m44-a	CGGCAAACGCAAAAGCAGATACACGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	140
m44-b	TCAACGCCATCGTACGCACAACGACAACGGCAAACGCAAAAGCAG	141
m45-a	ATCGTACGCACAAAAGCAGATGGTCGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	142
m45-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAAAGCAG	143
m46-a	ATCGTACGCACAAAACGTGATGGTCGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	144
m47-a	ATCGTACGCGGTAAACGTGATACACGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	145
m48-a	CGTACGCGGTAAAACAGATGGTCGCACAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	146
pre-lon a	GGGTAACTTTAACAAGGAGAAAAACATGAACAAGAAAAACATCCTGCC	147
pre-lon b	GGCGTAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAACAAGGAGAAAAAC	148
pre-lon c	GCTTGCCTCCAACCCC	149
wt-aydgv	CGAAGCTTAAACGCCATCGTACGCACAAAACGTGATAC	150
mC-aydgv	CGAAGCTTAAACGCCATCGTACGCAC	151
mT-aydgv	CGAAGCTTAAACGCCATCGTACGCG	152
mS-aydgv	CGAAGCTTAAACGCCATCGTACGCAG	153
wt-GS	CGAAGCTTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCAACGCCATCGTACGCAC	154
mT-GS	CGAAGCTTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCAACGCCATCGTACGCG	155
mS-GS	CGAAGCTTAGCTGCCGCTGCCGCTGCCAACGCCATCGTACGCAG	156
mT-GG	CGAAGCTTACCCGCCCGCCCGCCCGCCCAACGCCATCGTACGCG	157
mCS-GG	CGAAGCTTACCCGCCCGCCCGCCCGCCCAACGCCATCGTACGCA	158

10

20

30

40

【表 1 3 - 2】

primer	塩基配列	配列 番号
m49	TCAACGCCATCGTACGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m50	TCAACGCCATCGTACGCACATGCACAAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m51-a	ACAATAACAAATGCAAACACATGCACAAACGCAGAAGCAGATACATGCA CAAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m51-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCACAAATACAAAAACAAT AACAAATGCAAACACATGC	
m52-a	CACAGTAGCAAAAACACACACAAACGCAGAAGCAGATACATGCACAAAC GCTTGCCTCCAACCCC	
m52-b	ACAATAACAAATGCAAACACATGCACAAAAACAATACAGTAGCAAGCAC AGTAGCAAAAACACACAC	
m53-a	CGTACGCGGTACGGGTGTCGGTGTGCGGTACGGCTTGCCTCCAACCCC	
m53-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCGGTACGGG	
m54-a	ATCGTACGCAGAACGAGAGTCAGAGTCAGAACGGCTTGCCTCCAACCCC	
m54-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAGAACGAGAG	
m55	GTACGCGCAACAACAGCAGCAACAGCTTGCCTCCAACCCC	
m56	GCCATCGTACGCCGTGGTGGTCGTCGTGGTGGCTTGCCTCCAACCCC	
m57-c	CATCGTACGCAGATGATGAAGAAGATGAGCTTGCCTCCAACCCC	
m57-d	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCAGATGATGAAG	
m58	ATCGTACGCGGTAAACGTGATGGTCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m59	ATCGTACGCGGTAAACGTGATGGTCGCAAAAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m68	TCAACGCCATCGTACGCGCAACAACAGCATAACGCAAAAACGCTTGCCT CCAACCCC	
n119	TCAACGCCATCGTACGCGGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m196	TCAACGCCATCGTACGCACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m197	TCAACGCCATCGTACGCACACGCCGTAACACAAAACGTGATACACGCCG TAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m198-a	GCCGTAACACAAAACGTGATACACGCCGTAACGCTTGCCTCCAACCCC	
m198-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAATAGAAACACACGCCGTAACACAAAACG TG	
m199-a	TGTAACAAATAGAAACACACGCCGTAACACAAAACGTGATACACGCCGTA ACGCTTGCCTCCAACCCC	
m199-b	TCAACGCCATCGTACGCGGTAATACAGAAGGTGTAACAAATAGAAACACA CGC	

10

20

30

40

【表 1 3 - 3】

m200-a	AAGAAATACAAACGGTTGCACAAAAGGTAATACAGAAGGTGTAACAAATA GAAACACACGC	
m200-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAATGGTGAAACAGTAAGAAATACAAACGGT TGAC	
m201	TCAACGCCATCGTACGCACAAATGGTAACACACGCCGTAACACAAAACG TG	
m202-a	TGTAACAAATGGTAACACACGCCGTAACACAAAACGTGATACACGCCGTA ACGCTTGCCCTCCAACCCC	
m202-b	TCAACGCCATCGTACGCCGTAATACAGAAGGTGTAACAAATGGTAACACA CG	
m203-a	AAGTAATACAAACGGTTGCACAAAAGGTAATACAGAAGGTGTAACAAATG GTAACACACG	
m203-b	TCAACGCCATCGTACGCACAAATGGTGAAACAGTAAGTAATACAAACGGT TGAC	
m35-N-b	CGAAGCTTAAGATGGCTCAACGCCATCGTACGCGCAACAACAGC	

10

【表 1 4】

wt-EGS1	CCGCTGCCGCTACCCCTCAACGCCATCGTACGCACAAAACGTG	159
GS3an2	TTTCCGCCCCCGTCCTAGCTGCCGCTGCCGCTACC	160
T7g10M	TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG	161
XC3pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNGCTTGCCCTCCAAC CCCG	162
XC4pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNGCTTGCC TCCAACCCCG	163
XC5pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNG CTTGCCCTCCAACCCCG	164
XC6pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNA CAMNNGCTTGCCCTCCAACCCCG	165
XC7pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNA CAMNNACAMNNGCTTGCCCTCCAACCCCG	166
XC8pool	ACCAACGCCATCGTACGCACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNACAMNNA CAMNNACAMNNACAMNNGCTTGCCCTCCAACCCCG	167
XCST3pool	ACCAACGCCATCGTACGCASWMNNASWMNNASWMNNGCTTGCCCTCCAAC CCCG	168
XCST4pool	ACCAACGCCATCGTACGCASWMNNASWMNNASWMNNASWMNNGCTTGCC CTCCAACCCCG	169
XCST5pool	ACCAACGCCATCGTACGCASWMNNASWMNNASWMNNASWMNNASWMNN GCTTGCCCTCCAACCCCG	170
XCST6pool	ACCAACGCCATCGTACGCASWMNNASWMNNASWMNNASWMNNASWMNN ASWMNNGCTTGCCCTCCAACCCCG	171
PatEpool.ex	TTTCCGCCCCCGTCCTAGCTGCCGCTGCCGCTACCAACGCCATCGTAC GC	172

20

30

40

【配列表フリーテキスト】

【0095】

配列番号 1 は、PatE のリーダー配列のアミノ酸配列である。

配列番号 2 及び 3 は、それぞれ、アゾリン骨格導入酵素による認識配列 1 の一例である

配列番号 4 - 9 は、それぞれ、アゾリン骨格導入酵素による認識配列2の一例である。
配列番号 10 - 57 は、新たにアゾリン骨格導入酵素の基質となることが確認されたアミノ酸配列である。

配列番号 58 は、PatEをコードする核酸の塩基配列である。

配列番号 59 は、PatEpreをコードする核酸の塩基配列である。

配列番号 60 は、野生型PatEのカセット領域のアミノ酸配列である。

配列番号 61 は、PatEpre2をコードする核酸の塩基配列である。

配列番号 62 は、(XC)nライブラリーの各化合物のペプチド部分をコードする核酸の塩基配列である。

配列番号 63 は、(XC)nライブラリーの各化合物のペプチド部分のアミノ酸配列である。

10

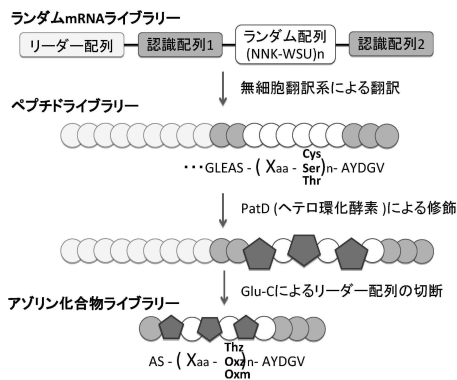
配列番号 64 は、(X-C/S/T)nライブラリーの各化合物のペプチド部分をコードする核酸の塩基配列である。

配列番号 65 は、(X-C/S/T)nライブラリーの各化合物のペプチド部分のアミノ酸配列である。

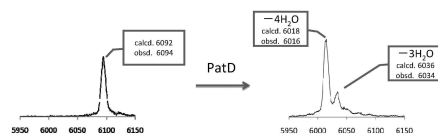
配列番号 66 - 172 は、本願実施例で用いられたプライマーの塩基配列である。

【図 1】

アゾリン化合物ライブラリーの合成スキーム

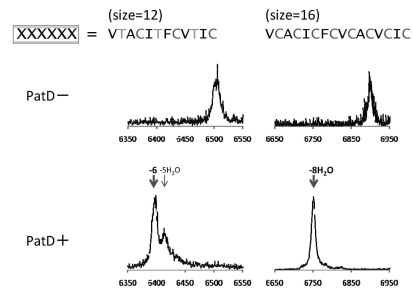


【図 2】



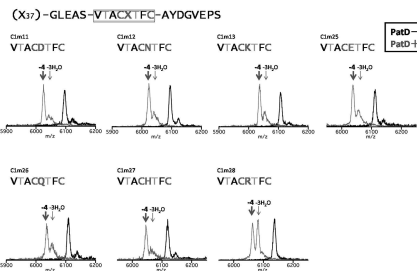
【図 3】

(X₃₇)-GLEAS-XXXXXX-AYDGVPEPS



【図 4】

PatDの基質許容性 — 親水性残基の効果 —

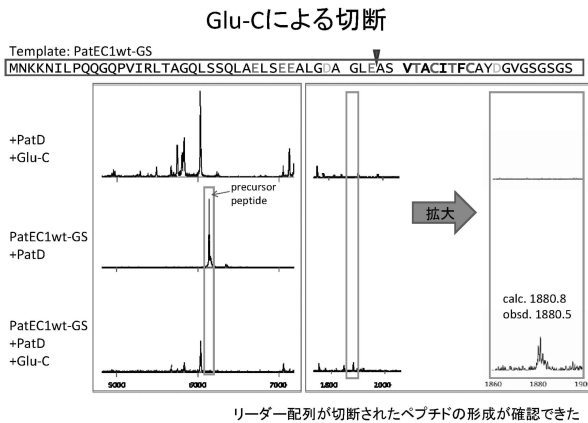


【図 5】

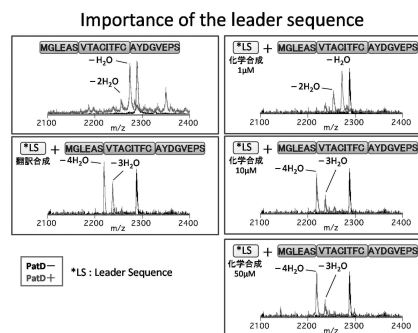
		カセット配列														観測された脱水数							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	7	6	5	4	3	2	1	0
1	C1wt	V	T	A	C	I	T	F	C														
2	m005	V	S	A	S	I	S	F	S														
3	m003	V	T	A	T	I	T	F	T														
4	m004	V	C	A	C	I	C	F	C														
5	m012	V	T	A	C	N	T	F	C														
6	m026	V	T	A	C	Q	T	F	C														
7	m013	V	T	A	C	K	T	F	C														
8	m027	V	T	A	C	H	T	F	C														
9	m028	V	T	A	C	R	T	F	C														
10	m011	V	T	A	C	D	T	F	C														
11	m025	V	T	A	C	E	T	F	C														
12	m023	N	T	A	C	I	T	F	C														
13	m024	K	T	A	C	I	T	F	C														
14	m034	R	T	A	C	I	T	F	C														
15	m022	D	T	A	C	I	T	F	C														
16	m015	V	C	A	C	N	C	F	C														
17	m016	V	C	A	C	K	C	F	C														
18	m033	V	C	A	C	R	C	F	C														
19	m040	V	S	A	S	D	S	F	S														
20	m039	V	T	A	T	D	T	F	T														
21	m014	V	C	A	C	D	C	F	C														
22	m036	R	C	D	C	D	R	C															

		カセット配列														観測された脱水数							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	7	6	5	4	3	2	1	0
23	m042	R	C	R	C	I	C	F	C	V	C	A	C	V	C								
24	m043	V	C	A	C	I	C	R	C	R	C	A	C	V	C								
25	m044	V	C	A	C	I	C	F	C	V	C	R	C	R	C								
26	m030	V	F	A	L	I	M	F	C														
27	m031	V	F	A	L	I	M	C	C														
28	m032	V	F	A	L	I	C	C	C														
29	m035	V	F	A	L	C	C	C	C														
30	m057	S	S	S	S	S	S	S	S														
31	m056	T	T	T	T	T	T	T	T														
32	m009	C	F	T	I	C	A	T	V														
33	m021	C	F	C	I	C	A	C	V														
34	m006	V	T	A	D	I	T	F	C														
35	m007	V	T	A	N	I	T	F	C														
36	m008	V	T	A	K	I	T	F	C														
37	m058	V	F	A	T	I	T	F	T														
38	m059	C	F	A	T	I	T	F	T														
39	m045	V	T	A	T	I	C	F	C														
40	m046	V	C	A	T	I	T	F	C														
41	m047	V	C	A	C	I	T	F	T														
42	m048	V	C	A	T	I	C	F	T														
43	m017	V	C	A	T	I	T	F	T														
44	m018	V	T	A	C	I	T	F	T														
45	m019	V	T	A	T	I	C	F	T														
46	m020	V	T	A	T	I	T	F	C														
47	m029	V	T	A	C	P	T	F	C														

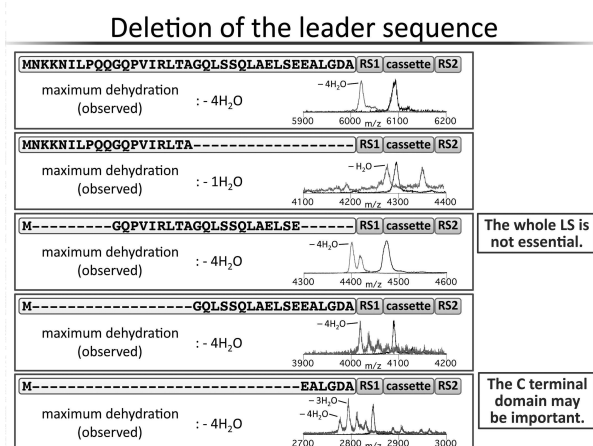
【図 6】



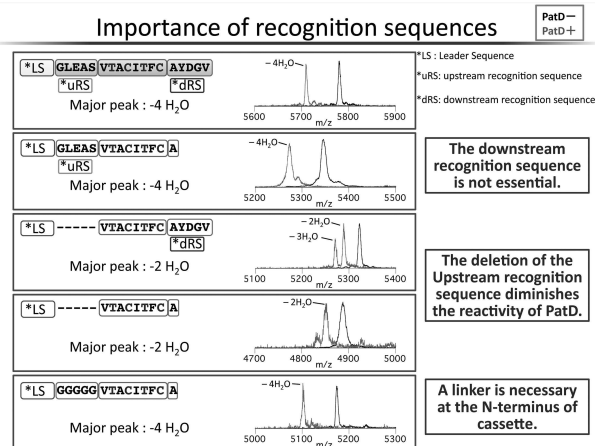
【図 7】



【図 8】

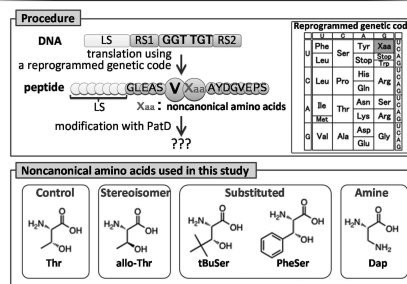


【図 9】



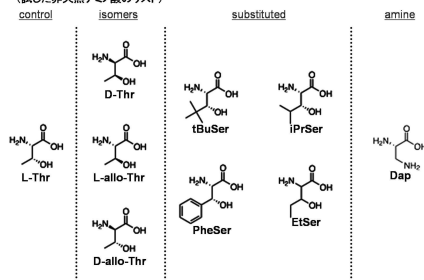
【図 10 A】

Biosynthesis of exotic azoline backbones



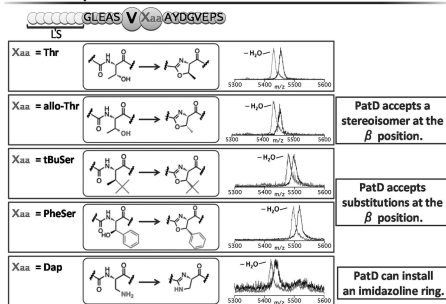
【図 10 B】

非天然型のアミノ酸を導入・そして修飾することで非天然型のアゾリンを合成
(試した非天然アミノ酸のリスト)

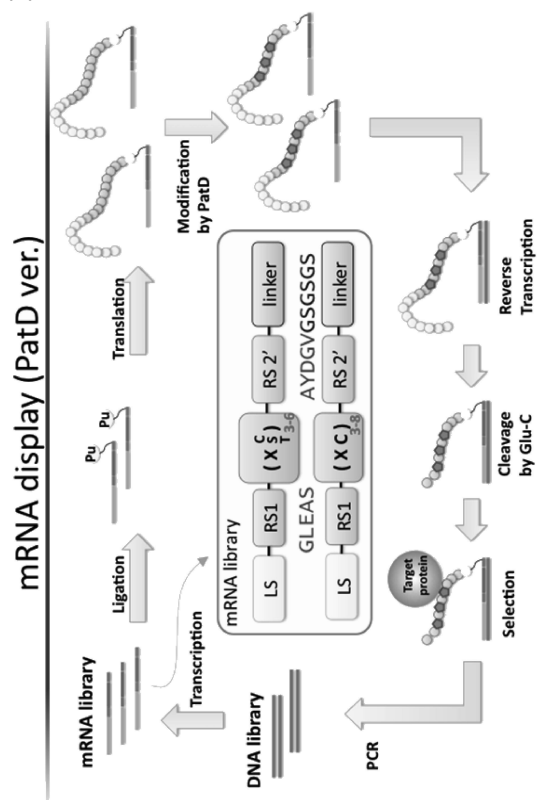


【図 11】

Biosynthesis of exotic azoline backbones

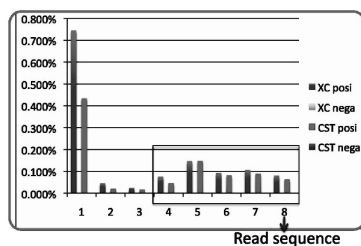


【図 12】



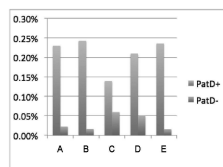
【図 13】

Result of selection



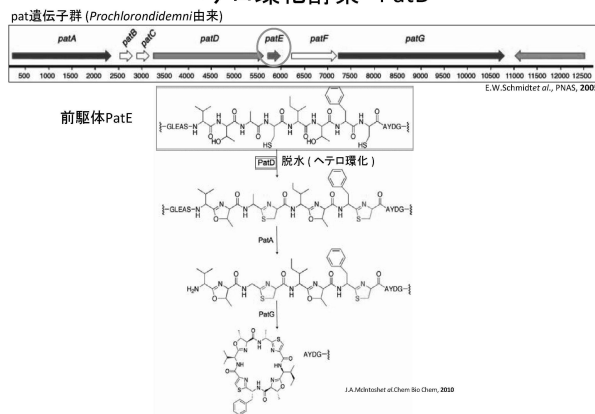
【図 14】

選択されたアゾリン含有化合物の結合能力評価



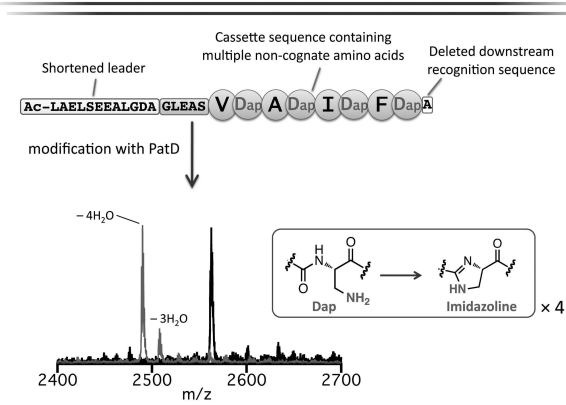
【図 15】

ヘテロ環化酵素 PatD



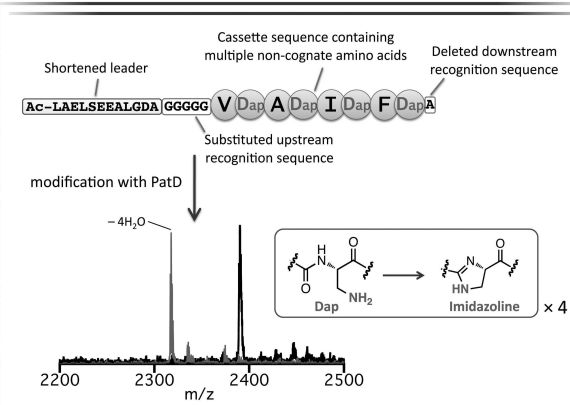
【図 16】

天然基質からかけ離れた合成ペプチドの修飾-1



【図 17】

天然基質からかけ離れた合成ペプチドの修飾-2



【図 18】

配列名	5	10	15	20	25	30	35	観測された脱水数	由来
1 m190	M	-----	ILASLSTFQOMWISKQYDEAGDA-					4	actin
2 m209	M	-----	FEQNSFNLLQEVTESELDLILGA-					3	actin 461
3 m139	M	ELQLRPSGLERKQAPFISLNTAQTGQGGDSQVLALNA-						0	ジャッフル

【図 19】

配列名	5	10	15	20	25	30	35	観測された脱水数
m117	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						4
m127	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						3
m111	M	-----	GQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-					2
m076	M	-----	GQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-					1
m114	M	-----	IRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-					0
m112	M	-----	IRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-					0
m113	M	-----	AGQLSSQLAELSEALGDA-					0
m075	M	-----	GQLSSQLAELSEALGDA-					0
m083	M	-----	LAELSEALGDA-					0
m082	M	-----	LAELSEALGDA-					0
m074	M	-----	LAELSEALGDA-					0
m080	M	-----	LSEALGDA-					0
m081	M	-----	EALGDA-					0
m088	M	-----	EALGDA-					0

【図 20】

配列名	5	10	15	20	25	30	35	観測された脱水数
C1wt	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						4
26A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						3
26N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						2
27G	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						1
27N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
28A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
28Q	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
29A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
29N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
30A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
31A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
31Q	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
32A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
32Q	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
33G	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
33N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
34A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
34N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
35A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
36A	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
36N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
37G	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
37N	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p1	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p2	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p3	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p4	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p5	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p6	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p7	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p8	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p9	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p10	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p11	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p12	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p13	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p14	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p15	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p16	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p17	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m126	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p21	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m171	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m172	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m173	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m174	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m175	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m225	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m176	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m125	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m170	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m169	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m168	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m187	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
35P	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
30P	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p18	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p19	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
p20	M	NKKNILPQQGQPVIRLTAGQLSSQLAELSEALGDA-						0
m088	M	-----	EALGDA-					0

【図 21】

配列名	5	10	15	20	25	30	35	観測された脱水数
C1wt	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVPEPS					4
C1wt-R3	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVPEPSRRR					3
m167	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGV					2
C1wt-GS	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVGSGSGS					1
C1m11-GG	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVGSGSGSGS					0
C1wt-EGS	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVGSGSGSGS					0
C1wt-VR	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYDGVRRR					0
m220	LS	-----	GLEAC-VTACITFC-AYDGV					0
m221	LS	-----	GLEAT-VTACITFC-AYDGV					0
m061	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-AYD					0
m062	LS	-----	GLEAS-VTACITFC-A					0
m060	LS	-----	EAS-VTACITFC-AYDGVPEPS					0
m066	LS	-----	EAS-VTACITFC-A					0
m067	LS	-----	EAS-VTACITFC					0
m063	LS	-----	AS-VTACITFC-AYDGVPEPS					0
m064	LS	-----	S-VTACITFC-AYDGVPEPS					0
m065	LS	-----	VTACITFC-AYDGVPEPS					0
m167	LS	-----	VTACITFC-AYDGV					0
m070	LS	-----	VTACITFC-A					0
m071	LS	-----	VTACITFC					0
m163	LS	-----	GGGGG-VTACITFC-AYDGV					0
m191	LS	-----	QQQQQ-VTACITFC-AYDGV					0
m192	LS	-----	LLLLL-VTACITFC-AYDGV					0
m193	LS	-----	PPPPP-VTACITFC-AYDGV					0
m120	LS	-----	GGGGG-VTACITFC-GGG					0
m161	LS	-----	GGGGG-VTACITFC-G					0
m162	LS	-----	GGGGG-VTACITFC-A					0
m121	LS	-----	GGGGG-VTACITFC					0
m122	LS	-----	VTACITFC-GGG					0
m216	LS	-----	GGGGG-GLEAS-VTACITFC-AYDGV					0
m219	LS	-----	GLEAS-GGGGG-VTACITFC-AYDGV					0
m224	LS	-----	GGGGG-GLEAS-VTACITFC-AYDGV					0
m222	LS	-----	GGGGG-GLEAC-VTACITFC-AYDGV					0
m223	LS	-----	GGGGG-GLEAT-VTACITFC-AYDGV					0

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 4 0 B 50/06 (2006.01) C 4 0 B 50/06
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

(72)発明者 後藤 佑樹
 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
 (72)発明者 伊藤 悠美
 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

合議体
 審判長 大宅 郁治
 審判官 福井 悟
 審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 国際公開第2007/103739(WO,A2)
 ChemBioChem, 2010, vol.11, no.10, pp.1413-1421, support. info. pp.1-16
 化学フロンティア22 生命現象を理解する分子ツール-イメージングから生体機能解析まで,
 2010年 9月24日,第1版 第1刷, 71-78
 有機合成化学協会誌,2010年 3月,Vol.68, No.3,217-227
 Nat. Chem. Biol., 2006, vol.2, no.12, pp.729-735

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
 C12N15/00-15/90
 C07K2/00-7/66
 C12P21/00-21/04
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d