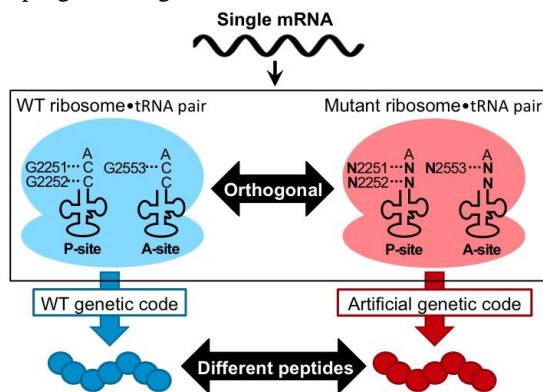


## Annual Research Highlights

### (1) “An orthogonal ribosome-tRNA pair via engineering of the peptidyl transferase center”

In living organisms, proteins and peptides are synthesized by ribosomal translation system, in which 20 different amino acids on the 3'-end of corresponding tRNAs sequentially form peptide bonds according to mRNA sequence. In wild-type translation system, the Watson-Crick base pairs between the 3'-end of tRNAs (C74 and C75) and 23S ribosomal RNA (rRNA) G2251, G2252 at the P site as well as G2553 at the A site are universally conserved. Here, we revealed that the introduction of compensatory mutations at these positions leads to an orthogonal translation system independent of the wild-type counterpart. This is the first report that peptides could be successfully translated by such tRNA-ribosome pairs with the compensatory mutations. Moreover, we also demonstrated that the wild-type and orthogonal machineries could function in parallel, producing two different peptides from a single mRNA template using two artificially reprogrammed genetic codes (Fig. 1). This work thus established a new way to reprogram the genetic code.



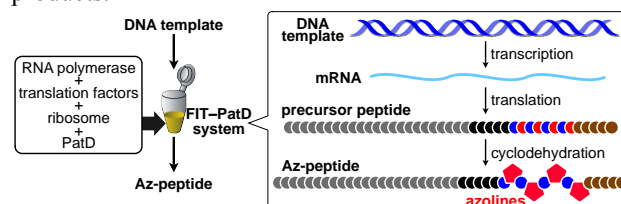
**Fig. 1** Parallel synthesis of two different peptides from one mRNA using orthogonal ribosome-tRNA pairs.

1.(1)-1) *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 555 (2014).

### (2) “One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase”

Azoline moieties in the backbones of peptidic natural products are important structural motifs that contribute to diverse bioactivities. Some azoline-containing peptides (Az-peptides) are produced from ribosomally synthesized precursor peptides, in which cysteine, serine, and threonine residues are converted to their corresponding azolines by posttranslational modification through a cyclodehydratase. We have devised an in vitro biosynthesis system of Az-peptides, referred to as the FIT-PatD system, by the integration of a cell-free translation system with the posttranslational

cyclodehydratase PatD. This system enabled the “one-pot” synthesis of a wide variety of Az-peptide derivatives expressed from synthetic DNA templates. The FIT-PatD system also facilitated mutagenesis studies on a wide array of precursor peptide sequences, unveiling unique in vitro substrate tolerance of PatD. This artificial biosynthetic system will allow us to accelerate studies on the biosynthetic enzymes and expanding the chemical diversity of natural products as “pseudo-natural products.”

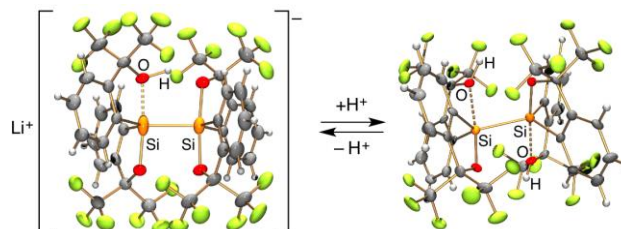


**Fig. 2** In vitro biosynthesis of azoline-containing peptides in the FIT-PatD system.

1.(1)-2) *Chem. Biol.*, **21**, 766 (2014).

### (3) “Control of properties of the silicon-silicon bonded compounds reflecting the changes in the charges”

A silicon-silicon bond is a fundamental unit of silicon compounds such as oligosilanes and polysilanes, and the conformation of the silicon chain affects their photophysical properties. Reversible conversion of a silane moiety to a silicate moiety would be interesting as a method for control of properties of the Si-Si bond compounds. Stepwise twofold protonation of the disilicate, which is a dianionic species with a bond between two silicon atoms, by treatment with hydrochloric acid gave the corresponding disilane via the silylsilicate. Both the disilane and silylsilicate were reversibly transformed to the disilicate by deprotonation with bases. In the stepwise interconversion processes, changes in conformation around the silicon atoms, oxidation potentials, and UV spectroscopic properties were confirmed. Control of these properties in response to the changes in the charges has been achieved by simple and reversible acid-base reactions.



**Fig. 3** Control of the configuration around the silicon atoms.

1.(1)-15) *Organometallics*, **33**, 2358 (2014).

研究ハイライト

(1) ペプチド鎖転移反応活性中心部位の改変による直交型リボソーム-tRNA ペアの開発

生体内におけるタンパク質やペプチドの合成は、tRNA の 3'末端に連結された 20 種類のアミノ酸がリボソーム上で mRNA 配列依存的に順次ペプチド結合を形成してゆくことによって行われている。天然型の大腸菌リボソーム翻訳系においては、23S リボソーム RNA の 2251、2252、2553 位がそれぞれペプチジル tRNA の 75、74 位およびアミノアシル tRNA の 75 位と G-C 塩基対を形成するが、今回我々はこの対合様式を相補的な C-G 塩基対に置き換えることにより、天然型リボソームとは直交する変異型リボソーム-tRNA ペアの作出に成功した。tRNA の末端と 23S リボソーム RNA との対合様式についてはこれまでに解析例があったが、実際に変異型リボソームを用いてペプチドの翻訳に成功したのは初めての事例となる。さらに、この変異型リボソームと天然型リボソームを同一反応系中に共存させ、それぞれのリボソームに異なる遺伝暗号を割り当てることにより、1 種類の mRNA から同時に 2 種類の異なる配列を持つペプチドを翻訳合成することに成功した (図 1)。

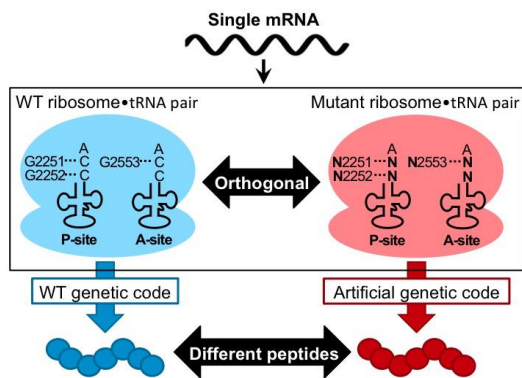


図 1 直交する 2 つのリボソーム翻訳系を用い、1 種類の mRNA からの 2 種類のペプチドを同時翻訳した

1.(1)-1) *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 555 (2014).

(2) 無細胞翻訳系と翻訳後脱水環化酵素を組み合わせた人工生成系を用いたアゾリン骨格含有ペプチドのワンポット生成

アゾリン骨格は、ペプチド性の天然物に広く見られる重要な主鎖骨格であり、天然物の多種多様な生物活性に大きく寄与している。一部のアゾリン骨格含有ペプチドの生成過程においては、翻訳合成された前駆体ペプチド中に含まれる Cys/Ser/Thr 残基が翻訳後修飾酵素によって脱水環化されることで、対応するアゾリン骨格へと変換されることが知られている。我々は、人工改変が可能な無細胞翻訳系と翻

訳後脱水環化酵素 PatD とを試験管内で組み合わせた人工生成系を確立し、FIT-PatD システムと名付けた。当該生成系は、多種多様な人工アゾリンペプチドを、対応する鋳型 DNA からワンポットかつ簡便に合成することが可能である。また FIT-PatD システムは、前駆体ペプチド配列の網羅的な変異実験も可能とし、PatD がこれまでに予想されていたよりも飛躍的に幅広い基質許容性を示す事を明らかにした。今回確立された人工生成系により、PatD 酵素の生化学的特性の理解や、天然物の構造多様性を人工的に拡張した『擬天然物』の開発が進むことが期待される。

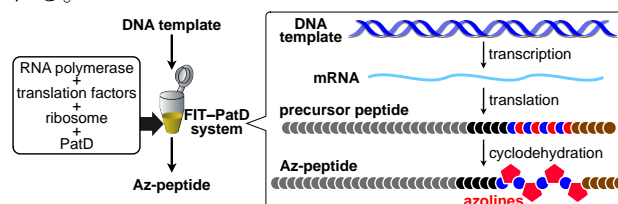


図 2 FIT-PatD を用いたアゾリン骨格含有ペプチドの試験管内生成

1.(1)-2) *Chem. Biol.*, **21**, 766 (2014).

(3) ケイ素-ケイ素化合物の電荷連動型物性制御

ポリシランの骨格構造はケイ素-ケイ素結合で形成され、その配座は化合物の物性に決定的な影響を及ぼす。ケイ素原子の配位数や電荷の変化に連動する物性制御を目指し、ケイ素-ケイ素結合鎖の最小単位である二つのケイ素原子が結合した化合物 (ジシリカート) の酸塩基反応を行った。ジシリカートに酸を加えてプロトン化を段階的に行うと、モノアニオン性化合物 (シリルシリカート) と中性化合物 (ジシラン) が逐次得られた。生成物に対して塩基を加えれば逆反応が進行し、三つの化合物間での相互変換ができた。三種類の化合物でケイ素-ケイ素結合近傍の配座は大きく変化した。ジシリカートのプロトン化が段階的に進むにつれて酸化されにくくなるとともに、紫外光領域の吸収波長の深色移動が観測された。このように、ケイ素-ケイ素結合化合物の酸塩基反応による段階的な電荷の増減によって、分子骨格構造と物性を制御できた。

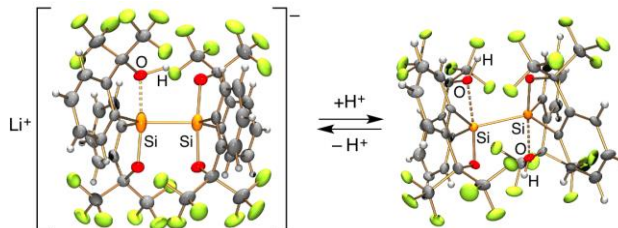


図 3 酸塩基反応によるケイ素原子近傍の配座制御

1.(1)-15) *Organometallics*, **33**, 2358 (2014).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) N. Terasaka, G. Hayashi, T. Katoh, H. Suga, "An orthogonal ribosome-tRNA pair via engineering of the peptidyl transferase center", *Nat. Chem. Biol.* **10**, 555 (2014).
- 2) Y. Goto, Y. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, H. Suga, "One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase", *Chem. Biol.* **21**, 766 (2014).
- 3) A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Sakiyama, C.J. Hipolito, A. Fujioka, R. Hirokane, K. Ikeguchi, B. Watanabe, J. Hiratake, *et al.*, "Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 4049 (2014).
- 4) K. Torikai, H. Suga, "Ribosomal synthesis of an amphotericin-B inspired macrocycle", *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 17359 (2014).
- 5) R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, K.V. Tabata, L. Yamauchi, S. Hyeon Kim, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Suga, *et al.*, "Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity", *Nat. Commun.* **5**, 4519 (2014).
- 6) K. Yamagata, Y. Goto, H. Nishimasu, J. Morimoto, R. Ishitani, N. Dohmae, N. Takeda, R. Nagai, I. Komuro, H. Suga, *et al.*, "Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change", *Structure* **22**, 345 (2014).
- 7) M. Das, O. Vargas-Rodriguez, Y. Goto, H. Suga, K. Musier-Forsyth, "Distinct tRNA recognition strategies used by a homologous family of editing domains prevent mistranslation", *Nucleic Acids Res.* **42**, 3943 (2014).
- 8) B.J. Desai, Y. Goto, A. Cembran, A.A. Fedorov, S.C. Almo, J. Gao, H. Suga, J.A. Gerlt, "Investigating the role of a backbone to substrate hydrogen bond in OMP decarboxylase using a site-specific amide to ester substitution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 15066 (2014).
- 9) K. Kumazaki, T. Tsukazaki, T. Nishizawa, Y. Tanaka, H.E. Kato, Y. Nakada-Nakura, K. Hirata, Y. Mori, H. Suga, N. Dohmae, *et al.*, "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of YidC, a membrane-protein chaperone and insertase from *Bacillus halodurans*", *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 1056 (2014).
- 10) T. Shimada, K. Shimada, M. Matsui, Y. Kitai, J. Igarashi, H. Suga, A. Ishihama, "Roles of cell division control factor SdiA: recognition of quorum sensing signals and modulation of transcription regulation targets", *Genes Cells* **19**, 405 (2014).
- 11) C. Crews, C. Hertweck, K. Shokat, H. Suga, M. Kostic, "Reflecting on the past and looking forward to the future of bridging chemistry and biology", *Chem. Biol.* **21**, 1035 (2014).
- 12) S. Adachi, M. Homoto, R. Tanaka, Y. Hioki, H. Murakami, H. Suga, M. Matsumoto, K.I. Nakayama, T. Hatta, S. Iemura, *et al.*, "ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway", *Nucleic Acids Res.* **42**, 10037 (2014).
- 13) Y. Daicho, N. Kano, M. Yukimoto, M. Minoura, T. Kawashima, "Synthesis, Structure, and Thermolysis of Tetracoordinated 1 $\lambda^4$ ,2-Selenazetidines Bearing Two Chiral Centers at the 3- and 4-Positions", *Heteroat. Chem.* **25**, 492 (2014).
- 14) Y. Daicho, Y. Watanabe, N. Kano, M. Yukimoto, M. Minoura, T. Kawashima, "Aziridine formation with retention of configuration from a pentacoordinated 1,2-thiazetidine bearing two chiral centers at the 3- and 4-positions", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **87**, 1005 (2014).
- 15) N. Kano, K. Sasaki, H. Miyake, T. Kawashima, "Synthesis and Isolation of a Silylsilicate Containing Two Pentacoordinated Silicon Atoms by Monoprotonation of a Disilicate and Monodeprotonation of a Disilane", *Organometallics* **33**, 2358 (2014).

### (2) その他

- 1) H. Suga, "A RaPID way to discover bioactive natural product-like peptides –Akabori Memorial Award Lecture–", *Peptide Science*, **51**, 1-4 (2014).
- 2) C.J. Hipolito, A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Sakiyama, A. Fujioka, R. Hirokane, Y. Kimura, K. Ueda, H. Kato, H. Suga, "Locking the transmembrane helices of a eukaryotic P-glycoprotein homolog using a macrocyclic peptide ligand", *Peptide Science*, **51**, 57-8 (2014).
- 3) Y. Kato, Y. Goto, H. Suga, "Attempts at in vitro reconstitution of a post-translational dehydrogenase toward synthesis of azole-containing peptides", *Peptide Science*, **51**, 137-8 (2014).
- 4) R. Takatsuji, T. Katoh, H. Suga, "Preparation of mercaptoacyl-tRNAs for ribosomal thioester bond formation", *Peptide Science*, **51**, 139-40 (2014).
- 5) Y. Iwane, A. Hitomi, Y. Goto, T. Katoh, H. Murakami, H. Suga, "Accurate assignment of a nonproteinogenic

amino acid and valine to the valine GUN codon box”, *Peptide Science*, **51**, 141-2 (2014).

## 2. 総説・解説

- 1) T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, "Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides", *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 727 (2014).
- 2) T. Passioura, H. Suga, "Reprogramming the genetic code in vitro", *Trends Biochem. Sci.* **39**, 400 (2014).
- 3) C.J. Hipolito, N.K. Bashiruddin, H. Suga, "Protein cocrystallization molecules originating from in vitro selected macrocyclic peptides", *Curr. Opin. Struct. Biol.* **26**, 24 (2014).
- 4) N. Terasaka, H. Suga, "Flexizymes-facilitated genetic code reprogramming leading to the discovery of drug-like peptides", *Chem. Lett.* **43**, 11 (2014).
- 5) 後藤佑樹, “アゾリン骨格含有ペプチドの試験管内合成～擬天然物の簡便・自在合成を目指して”, 「化学と工業」67, 8, 707-8 (2014)
- 6) 後藤佑樹, “人工合成系による化合物生産～複雑な化合物を簡単に作る～”, 「生命化学研究レター」46, 4-9 (2014)
- 7) 長野正展, 吉富徹, 菅裕明, “未来を切り拓く特殊ペプチド創薬”, 「ファルマシア」50, 751-5 (2014)
- 8) 吉富徹, 長野正展, 菅裕明, “機能性大環状ポリペプチドの翻訳合成と RaPID 探索”, 「高分子」63, 712-4 (2014)

## 3. 著書

- 1) H. Suga, C.J. Hipolito, Y. Goto, T. Katoh, N.K. Bashiruddin, “In vitro synthetic biology of the genetic code: its development and applications”, *Synthetic Biology*, RSC Publishing, pp. 126-163 (2014).
- 2) 後藤佑樹, “若手研究者からのメッセージ”, 「日本化学会バイオテクノロジー部会ニュースレター」, 18, 11-3 (2014).

## 4. その他

- 1) 菅裕明, 後藤佑樹, 加藤保治 「アゾール骨格含有ペプチドの新規合成法とこれを用いた化合物ライブラリーの構築法と活性種探索法」 特許：特願 2014-018847.
- 2) 菅裕明, 後藤佑樹, 角田翔太郎 「ヘテロ環を含む化合物の製造方法」 特許：PCT/JP2014/056069, 14/772076(US).
- 3) 菅裕明 「大環状ペプチド、その製造方法、及び大環状ペプチドライブラリを用いるスクリーニング方法」 特許：PCT/JP2014/72338.
- 4) 菅裕明, 野地博行, 藤田大士, 渡邊力也 「高密度微小チャンバーアレイおよびその製造方法」 特許：PCT/JP2014/71585.
- 5) 菅裕明, 伊藤健一郎 「c-Met タンパク質アゴニスト」 特許：PCT/JP2014/77437.
- 6) 菅裕明, 後藤佑樹, 伊藤悠美 「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」 特許：14/003506(US)
- 7) 狩野直和, “化学：基礎を身につけてこそ楽しめる”, *東京大学新聞*, 2014年9月9日号 (第3788号), p.8.