

Annual Research Highlights

(1) “Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes.”

In ribosomal polypeptide synthesis the library of amino acid building blocks is limited by the manner in which codons are used. Of the proteinogenic amino acids, 18 are coded for by multiple codons and therefore many of the 61 sense codons can be considered redundant. Here we report a method to reduce the redundancy of codons by artificially dividing codon boxes to create vacant codons that can then be reassigned to non-proteinogenic amino acids and thereby expand the library of genetically encoded amino acids. To achieve this, we reconstituted a cell-free translation system with 32 *in vitro* transcripts of transfer RNA_{SNN} (tRNA_{SNN}) (S = G or C), assigning the initiator and 20 elongator amino acids. Reassignment of three redundant codons was achieved by replacing redundant tRNA_{SNNs} with tRNA_{SNNs} pre-charged with non-proteinogenic amino acids. As a demonstration, we expressed a 32-mer linear peptide that consists of 20 proteinogenic and three non-proteinogenic amino acids, and a 14-mer macrocyclic peptide that contains more than four non-proteinogenic amino acids.

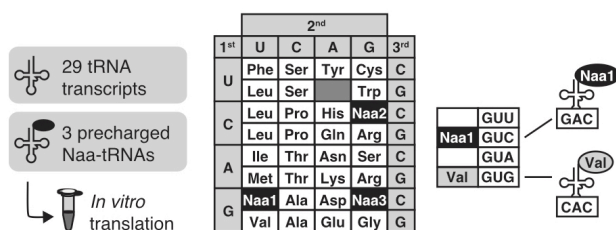


Fig. 1 Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes.

1.(1)-3) *Nat. Chem.*, **8**, 317-25 (2016).

(2) “D-arm motif in tRNA^{Pro} recognized by EF-P for acceleration of Pro-Pro formation”

Ribosome is prone to stall on translation of polyproline sequences due to the very slow peptidyl transfer reaction, and EF-P alleviates the ribosomal stalling by accelerating the peptidyl transfer reaction between the prolines. However, the mechanism by which EF-P recognizes the stalled complexes and accelerates peptide bond formation has been not understood. Here, we investigated how mutations in tRNA^{Pro} affect EF-P function, and showed that the 9-nt D-loop closed by the stable D-stem sequence in tRNA^{Pro} is a crucial recognition determinant for EF-P function. Such D-arm structures are shared among the three tRNA^{Pro} isoacceptors in *Escherichia coli*. Thus, the activity of EF-P is controlled by recognition elements in the tRNA D-arm. These results indicate that EF-P

selectively improves the incorporation of proline among the 20 proteinogenic amino acids by recognizing the tRNA structure.

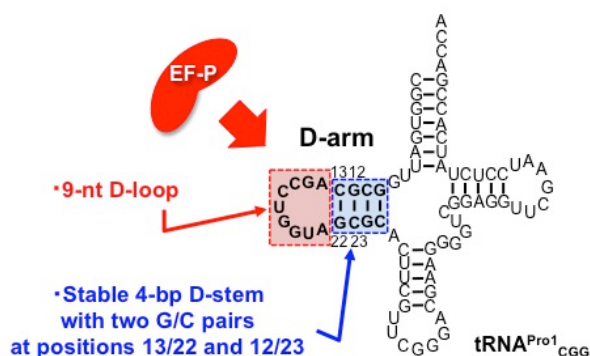


Fig. 2 Recognition of D-arm of tRNA^{Pro} by *E. coli* EF-P

1.(1)-6) *Nat. Commun.*, **7**, 11657 (2016)

(3) “Synthesis of a dianionic compounds with a bond between pentacoordinated tin atoms”

Homonuclear E–E bonds between heavier group 14 elements (E = silicon, germanium and tin), which are analogues of C–C bonds, are important as fundamental structural units of group 14 element compounds. Changes in the coordination number of the central elements would cause drastic changes in both their structure and properties. Here, we synthesized the first dianionic compounds bearing a bond between pentacoordinated tin atoms. Reductive homocoupling of an anionic pentacoordinated tin compound bearing a tin–fluorine bond gave the corresponding tin–tin bonded compound in a stable form. The X-ray crystallographic analysis showed the trigonal bipyramidal structures around the tin atoms and the single bond length of the tin–tin bond. The ¹¹⁹Sn NMR spectroscopy and DFT calculations revealed the high s-character of the bond, suggesting contributions of the sp²-hybridized orbitals to the tin–tin bond.

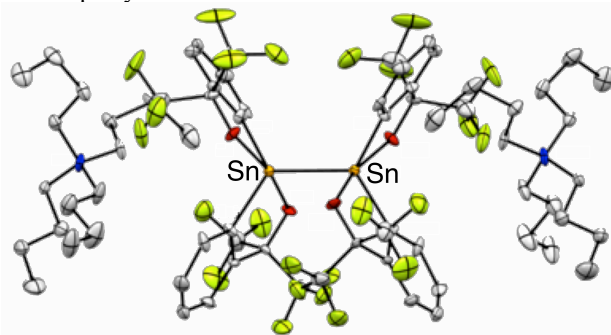


Fig. 3 Structure of the dianionic tin-tin bonded compound.

1.(1)-12) *Dalton Trans.*, **45**, 19374-19379 (2016).

研究ハイライト

(1) 人工分割したコドンボックスを組み込んだ遺伝暗号のリプログラミング法

翻訳反応系では、ビルディングブロックとして利用できるアミノ酸の種類は、遺伝暗号で規定された20種類のタンパク質性アミノ酸に限定される。このうち18種のアミノ酸は、複数のコドンで規定されており、天然の遺伝暗号におけるアミノ酸コードには、冗長性が存在すると言える。本研究では、人工的に分割したコドンボックスに複数種類のアミノ酸を同時にコードさせることで、アミノ酸規定の冗長性を減らし、翻訳反応で利用できるビルディングブロックの数を増加させる手法を開発した。具体的には、試験管内転写反応で調整した32種類のtRNA (tRNA_{SNN}) を用いて翻訳反応系を再構成した。このうち、冗長性のあるコドンボックスに対応したtRNA_{SNN} を人工アミノ酸で事前にアシル化したアミノアシル tRNA でおきかえることで、分割したコドンに望みの人工アミノ酸をコードさせることに成功した。本論文では、20種類のタンパク質性アミノ酸に加え、3種類の人工アミノ酸を同時に利用できる人工翻訳系を実証している。

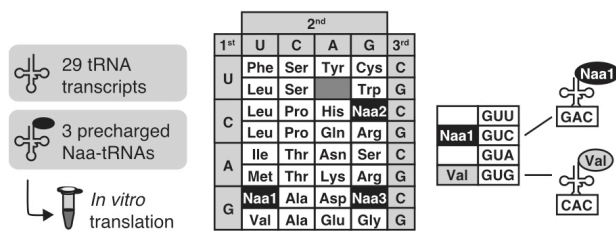


図1 人工分割したコドンボックスを組み込んだ遺伝暗号のリプログラミング法

1.(1)-3) *Nat. Chem.*, **8**, 317-25 (2016).

(2) プロリン連続ペプチドの翻訳における EF-P の tRNA 認識機構の解明

プロリンが連続する配列をもつペプチドの翻訳においては、プロリン間のペプチド鎖転移反応が遅いためリボソームが停止することが知られている。翻訳因子の一つである EF-P は、そのようなリボソームの停止を防ぐことにより翻訳を促進することが近年報告された。しかし、EF-P と Pro-tRNA との相互作用様式はこれまでに解明されておらず、翻訳促進のメカニズムについても不明であった。そこで、我々は様々な Pro-tRNA の変異体を作成し、EF-P と Pro-tRNA との相互作用様式を解析した。その結果、EF-P は大腸菌の3種類の tRNA(Pro) アイソアクセプ

ターの D アーム部分の構造を特異的に認識することによりプロリン間のペプチド鎖転移反応を促進することを明らかにした。この結果は、20種類天然アミノ酸の中でプロリンの導入効率のみを選択的に促進するために EF-P が tRNA(Pro) の構造を認識することを示唆している。

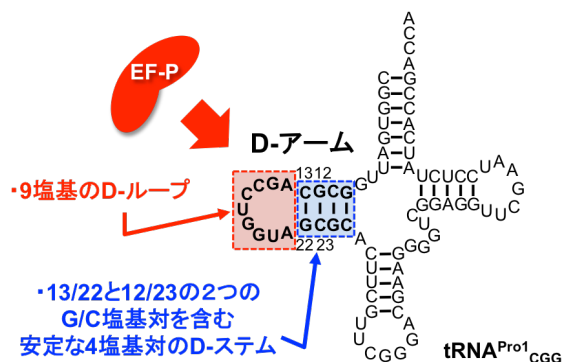


図2 大腸菌 EF-P による tRNA^{Pro1} の D-アームの認識

1.(1)-6) *Nat. Commun.*, **7**, 11657 (2016)

(3) 5 配位スズ-スズ結合化合物の合成

炭素-炭素結合に類似した高周期 14 族原子同士の結合は、14 族元素化合物の分子構造の基盤骨格を形成する。そのため、14 族元素が通常の 4 配位状態とは異なる配位数をとると、分子構造や性質に大きな変化が生じると考えられる。そこで我々は 5 配位スズ原子同士の結合をもつ化合物の合成をおこなった。スズ-フッ素結合をもつ 5 配位スズ化合物の還元的ホモカップリングによって、初めてのスズ-スズ結合をもつジアニオン性化合物を合成した。X 線結晶構造解析からスズ原子周りが三方両錐構造であることと、スズ-スズ結合が一般的な単結合と同程度の長さであることがわかった。¹¹⁹Sn NMR における非常に大きな ¹J(Sn-Sn) 結合定数と DFT 計算の結果から、スズ-スズ結合はスズ原子の sp² 混成軌道の重なりによる単結合であることが明らかとなった。

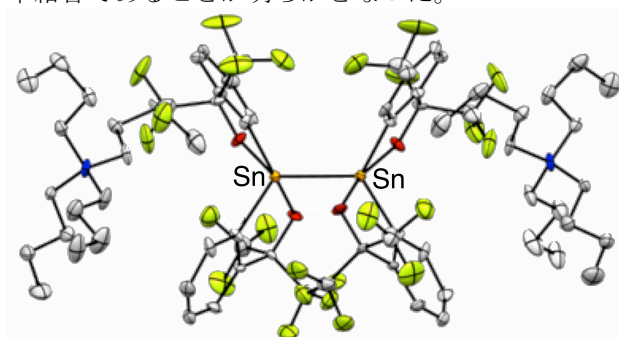


図3 ジアニオン性 5 配位スズ-スズ結合化合物の構造

1.(1)-12) *Dalton Trans.*, **45**, 19374-19379 (2016).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) N. Bayó-Puxan, R. Rodríguez-Mias, M. Goldflam, M. Kotev, S. Ciudad, C.J. Hipolito, M. Varese, H. Suga, R. Campos-Olivas, X. Barril, V. Guallar, M. Teixidó, J. García, E. Giralt, "Combined use of oligopeptides, fragment libraries, and natural compounds: A comprehensive approach to sample the druggability of vascular endothelial growth factor." *ChemMedChem*, **11**, 928-39 (2016).
- 2) T. Fujino, Y. Goto, H. Suga, H. Murakami, "Ribosomal synthesis of peptides with multiple β -amino acids." *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 1962-9 (2016).
- 3) Y. Iwane, A. Hitomi, H. Murakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, "Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes." *Nat. Chem.*, **8**, 317-25 (2016).
- 4) K.B. Lee, C.Y. Hou, C.E. Kim, D.M. Kim, H. Suga, T.J. Kang, "Genetic code expansion by degeneracy reprogramming of arginyl codons." *ChemBioChem*, **17**, 1198-201 (2016).
- 5) K. Futai, N. Terasaka, T. Katoh, H. Suga, "tRid, an enabling method to isolate previously inaccessible small RNA fractions." *Methods*, **106**, 105-11 (2016).
- 6) T. Katoh, I. Wohlgemuth, M. Nagano, M.V. Rodnina, H. Suga, "Essential structural elements in tRNA^{Pro} for EF-P-mediated alleviation of translation stalling." *Nat. Commun.*, **7**, 11657 (2016).
- 7) Y. Tomita, Y. Morita, H. Suga, D. Fujiwara, "DNA module platform for developing colorimetric aptamer sensors." *Biotechniques*, **60**, 285-92 (2016).
- 8) T. Kusakizako, Y. Tanaka, C.J. Hipolito, T. Kuroda, R. Ishitani, H. Suga, O. Nureki, "LCP crystallization and X-ray diffraction analysis of VcmN, a MATE transporter from *Vibrio cholerae*." *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **72**, 552-7 (2016).
- 9) K. Öjemalm, T. Higuchi, P. Lara, E. Lindahl, H. Suga, G. von Heijne, "Energetics of side-chain snorkeling in transmembrane helices probed by nonproteinogenic amino acids." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, 10559-64 (2016).
- 10) N. Terasaka, K. Futai, T. Katoh, H. Suga, "A human microRNA precursor binding to folic acid discovered by small RNA transcriptomic SELEX." *RNA*, **22**, 1918-28 (2016).
- 11) Y. Matsunaga, N.K. Bashiruddin, Y. Kitago, J. Takagi, H. Suga, "Allosteric inhibition of a Semaphorin 4D receptor Plexin B1 by a high-affinity macrocyclic peptide." *Cell Chem. Biol.*, **23**, 1341-50 (2016).
- 12) S. Tsukada, N. J. O'Brien, N. Kano, T. Kawashima, J.-D. Guo, S. Nagase, "The synthesis and structure of a dianionic species with a bond between pentacoordinated tin atoms: Bonding properties of the tin-tin bond", *Dalton Trans.*, **45**, 19374-79 (2016).

(2) その他

2. 総説・解説

- 1) C.J. Hipolito, K. Nishio, H. Suga, "In vitro selected macrocyclic peptides: Tools for regulating the conformational freedom of transmembrane proteins." *Yakugaku Zasshi*, **136**, 191-6 (2016).
- 2) M. Kostic, C.M. Crews, C. Hertweck, K. Shokat, H. Suga, "Cell chemical biology: Home of exciting chemical biology." *Cell Chem. Biol.*, **23**, 1-2 (2016).
- 3) M. Kostic, C.M. Crews, C. Hertweck, K. Shokat, H. Suga, "Voices of chemical biology: Charting the next decade." *Cell Chem. Biol.*, **23**, 199 (2016).
- 4) M. Kostic, C.M. Crews, C. Hertweck, K. Shokat, H. Suga, "Our advisors, our ambassadors, our editorial board members." *Cell Chem. Biol.*, **23**, 311-2 (2016).
- 5) M. Kostic, C.M. Crews, C. Hertweck, K. Shokat, H. Suga, "From powerful review articles to research breakthroughs." *Cell Chem. Biol.*, **23**, 883-4 (2016).
- 6) R. Maini, S. Umemoto, H. Suga, "Ribosome-mediated synthesis of natural product-like peptides via cell-free translation." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **34**, 44-52 (2016).
- 7) 後藤佑樹, "擬天然物創製を見据えた人工生合成系の開発", 「化学工業」, 株式会社化学工業社, **67**, 787-94 (2016).
- 8) 山田光博, 梅本詩織, 後藤佑樹, 菅裕明, "特殊ペプチド創薬 -第三の創薬シーズの可能性を拓く-", 「現代化学 4月号」, 株式会社東京化学同人, 38-41 (2016).

3. 著書

4. その他

- 1) 菅 裕明, バシルディン ナセル, 高木 淳一, 松永 幸子「プレキシンの結合調節剤」特許出願：特願 2016-120226.
- 2) 菅 裕明, Hao Yu, Patricia Dranchak, James Inglese, Tilde Carlow, Ryan MacArthur, Zhiru Li「寄生虫内の細菌性 Phosphoglycerate Mutase を標的とした環状ペプチド阻害剤」特許出願：62/373835.
- 3) 菅 裕明, 樋口 岳「安定化された二次構造を有するペプチド、及びペプチドライブラリー、それらの製造方法」特許：特許第 6004399 号.