

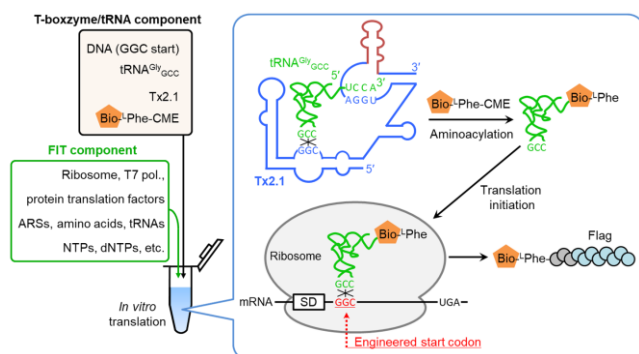
## Annual Research Highlights

### (1) “An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA-sensing T-box riboswitch”

In the present world, protein enzymes are responsible for the aminoacylation reaction (conjugating amino acid to the 3'-end of tRNA) in the ribosomal translation system. On the other hand, RNA world hypothesis suggests ribozymes catalyzed the aminoacylation reaction in the primitive translation system, but no such ribozymes have been found in modern organisms. Although various artificial aminoacylating ribozymes have been developed by *in vitro* molecular evolution method, they are not related to natural RNA sequences. Therefore, if we can evolve aminoacylating ribozymes from the RNAs of modern living organisms, the RNA world hypothesis will be further supported.

In this study, we partially randomized T-box riboswitch RNA from *Bacillus subtilis glyQS* and evolved it to Tx2.1, a ribozyme that recognizes tRNA anticodon and body sequences and catalyzes aminoacylation. Tx2.1 recognizes N-biotinyl-L-phenylalanine-cyanomethylester (Bio-Phe-CME) as a substrate. In other words, Tx2.1 catalyzes aminoacylation by recognizing both tRNA sequences and amino acid chemical structures, just like natural protein aminoacyl-tRNA synthetases. Furthermore, by integrating the reconstituted *in vitro* translation system with Tx2.1, aminoacylation and translation reactions can be completed in one-pot, resulting in the translation and synthesis of peptides containing unnatural amino acids (Fig. 1).

From these results, we can propose the hypothesis that aminoacylated ribozymes such as Tx2.1 existed in the hypothetical RNA world but had been replaced by protein enzymes in the process of evolution, and that the T-box riboswitch remains as a remnant of aminoacylating ribozymes. From a technical point of view, availability of the tRNA-recognizing Tx2.1 will lead us to consider a set of future experiments involving the engineering and evolution of T-boxzymes that potentially function in cellular environments.



**Fig. 1** Schematic illustration of *in vitro* translation coupled with aminoacylation ribozyme Tx2.1 to produce an artificial peptide.

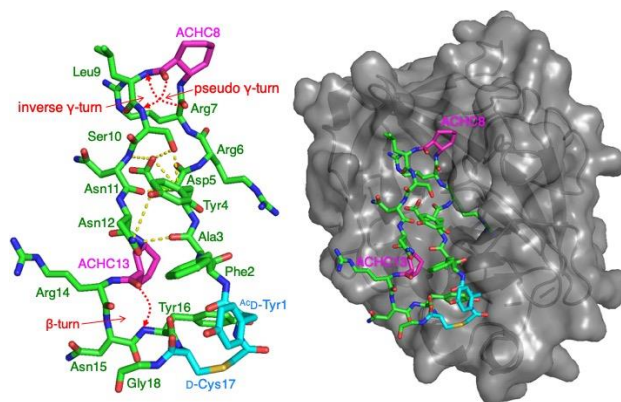
1.(1)-18) *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 702–709 (2020)

### (2) “Ribosomal synthesis of foldamer peptides containing cyclic $\beta$ -amino acids and its application to discovery of novel bioactive peptides”

$\beta$ -Amino acids can induce unique rigid folding structures of peptides, referred to as foldamers, owing to their turn/helix inducing abilities. Cyclic  $\beta^{2,3}$ -amino acids (c $\beta$ AAs), such as 2-aminocyclohexanecarboxylic acid (2-ACHC) and 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (2-ACPC), can act as particularly strong helix/turn inducers due to the structural rigidity derived from their constrained cyclic structures. Therefore, such foldamer peptides containing c $\beta$ AAs are an attractive platform for developing novel peptide drugs.

Although ribosomal incorporation of  $\beta$ -amino acids into peptides is intrinsically inefficient, particularly for their consecutive elongation, we improved the efficiency by developing an engineered tRNA, named tRNA<sup>ProIE2</sup>, bearing specific T-stem and D-arm motifs that efficiently recruit EF-Tu and EF-P to improve accommodation and peptidyl transfer, respectively. This tRNA enabled ribosomal incorporation of consecutive stereoisomeric c $\beta$ AAs derived from 2-ACPCs and 2-ACHCs. Remarkably, the most effective substrate, (1*S*,2*S*)-2-ACPC, could be extended for up to 10 consecutive residues.

Taking advantage of this strategy, we constructed a macrocyclic peptide library containing three kinds of c $\beta$ AAs and applied it to the RaPID discovery of ligands against human Factor XIIa (hFXIIa) and human interferon gamma receptor 1 (IFNGR1). The resulting peptides exhibited low- to sub-nM dissociation and inhibitory constants. X-ray analysis of a co-crystal of hFXIIa complexed with one of the inhibitors, F3, revealed that one of the (1*S*,2*S*)-2-ACHC residues induces the formation of two  $\gamma$ -turns and contributes to the folding of the peptide into an anti-parallel  $\beta$ -sheet. These results showed the potential of this platform to explore previously inaccessible sequence space of c $\beta$ AA-containing peptides.



**Fig. 2** X-ray structure of F3 bound to hFXIIa. 2.(1)-9) *Nat. Chem.*, **12**, 1081–1088 (2020).

研究ハイライト

(1)天然に存在する tRNA 認識 T-box リボスイッチから進化させたアミノアシル化リボザイム

現在の世界では、リボソーム翻訳系におけるアミノアシル化反応 (tRNA-3'末端とアミノ酸の結合) はタンパク質酵素が担っている。一方で RNA ワールド仮説における初期タンパク質翻訳系では、リボザイムがアミノアシル化反応を触媒していたと考えられるが、そのようなリボザイムは現存生物からは発見されていない。これまで試験管内分子進化法によって、様々な人工アミノアシル化リボザイムは開発されてきたが、天然の RNA 配列とは無関係である。そのため、現存生物が持つ RNA からアミノアシル化リボザイムを進化させることができれば、RNA ワールド仮説がさらに確かなものとなる。

今回我々は、*Bacillus subtilis* の *glyQS* 由来 T-box リボスイッチの一部をランダム化し、試験管内分子進化法によって、tRNA の配列を認識してアミノアシル化を触媒するリボザイム Tx2.1 を開発した。Tx2.1 は N-biotinyl-L-phenylalanine-cyanomethylester (Bio-Phe-CME)を基質として認識する。つまり Tx2.1 は天然のアミノアシル tRNA 合成酵素と同じように、tRNA 配列とアミノ酸の化学構造を認識してアミノアシル化を触媒する。さらに再構成試験管内翻訳系と Tx2.1 を組み合わせることで、アミノアシル化と翻訳反応が同一の溶液内 (ワンポット) で完結し、非天然アミノ酸含有ペプチドを翻訳合成することに成功した (図 1)。

これらの結果から、RNA ワールドにおいて Tx2.1 のようなアミノアシル化リボザイムが存在したが、その後の進化の過程で現在のようなタンパク質酵素に置き換わり、アミノアシル化リボザイムの名残として T-box リボスイッチが現在残っているという仮説が提唱できる。また、細胞内で機能するアミノアシル化リボザイムの開発へ展開可能である。

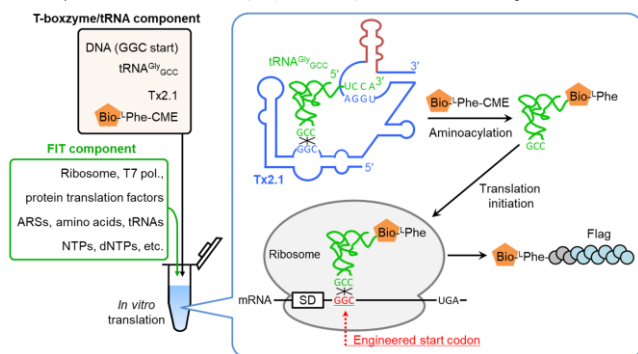


図 1 Tx2.1 を用いた、非天然アミノ酸アミノアシル化と非天然アミノ酸翻訳導入のワンポット反応。

1.(1)-18) *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 702–709 (2020)

(2)環状 β-アミノ酸含有フォルダマーペプチドの翻訳合成とペプチド創薬への展開

β-アミノ酸は、ペプチド鎖のターンやヘリックス構造を誘起することによりペプチド全体をフォルダマーと呼ばれる剛直な構造に折り畳むことができる。特に、2-aminocyclohexanecarboxylic acid (2-ACHC)や 2-aminocyclopentanecarboxylic acid (2-ACPC)のような環状 β<sup>2,3</sup>-アミノ酸 (cβAA) はその剛直な環構造ゆえに強力にターンやヘリックスを誘起することができ、cβAA を含むフォルダマーペプチドは新規ペプチド医薬を開発する基盤としても有力である。

しかしながら、β-アミノ酸の翻訳効率は著しく低く、特に連続導入は非常に困難であることが知られている。そこで、我々は tRNA<sup>Pro1E2</sup> と呼ばれる新型人工 tRNA を開発することにより β-アミノ酸の導入効率を向上させることに成功した。この tRNA は翻訳因子 EF-Tu 及び EF-P に対する結合力を高めた T-ステムおよび D-アーム構造をもち、アミノアシル tRNA のアコモデーションおよびペプチド鎖転移反応を促進する。これにより様々な立体の 2-ACHC と 2-ACPC の連続導入に成功し、特に(1*S*,2*S*)-2-ACPC に関しては 10 連続導入に成功した。

さらに我々は 3 種類の cβAA を含む大環状ペプチドライブラリを合成し、ヒト活性化第 XII 因子およびインターフェロン-γ 受容体 1 に対する阻害剤ペプチドの RaPID セレクションを実施した。得られたペプチドは数 nM~数百 pM の非常に強い結合力 (K<sub>D</sub> 値) と阻害活性 (K<sub>i</sub> 値) を示した。得られた阻害剤の 1 つ (F3) と第 XII 因子との共結晶構造解析を行ったところ、2 つの(1*S*,2*S*)-2-ACHC のうち 1 つが 2 つの γ-ターン構造を誘起し、ペプチドを逆並行 β-シートに折り畳む役割を果たすことが明らかになった。以上の結果から、cβAA を含むランダムペプチドライブラリはこれまでにない全く新しいペプチド医薬を開発する基盤として有効であることを示した。

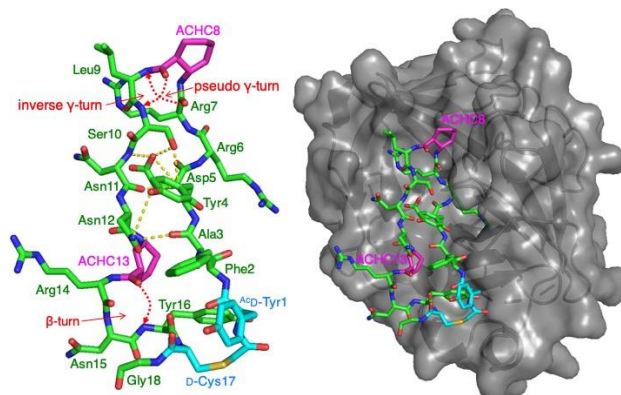


図 2 ヒト活性化第 XII 因子と F3 の共結晶構造

2.(1)-9) *Nat. Chem.*, **12**, 1081–1088 (2020).

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) Y. Goto & H. Suga. "In Vitro Biosynthesis of Peptides Containing Exotic Azoline Analogues", *ChemBiochem*, **21**, 84-87 (2020).
- 2) N.K. Bashiruddin, M. Hayashi, M. Nagano, Y. Wu, Y. Matsunaga, J. Takagi, T. Nakashima & H. Suga. "Development of cyclic peptides with potent in vivo osteogenic activity through RaPID-based affinity maturation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 31070-31077 (2020).
- 3) O. Vargas-Rodriguez, M. Bakhtina, D. McGowan, J. Abid, Y. Goto, H. Suga & K. Musier-Forsyth. "Human trans-editing enzyme displays tRNA acceptor-stem specificity and relaxed amino acid selectivity", *J. Biol. Chem.*, **295**, 16180-16190 (2020).
- 4) A.A. Vinogradov, E. Nagai, J.S. Chang, K. Narumi, H. Onaka, Y. Goto & H. Suga. "Accurate Broadcasting of Substrate Fitness for Lactazole Biosynthetic Pathway from Reactivity-Profiling mRNA Display", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 20329–20334 (2020).
- 5) K. Patel, L.J. Walport, J.L. Walshe, P.D. Solomon, J.K.K. Low, D.H. Tran, K.S. Mouradian, A.P.G. Silva, L. Wilkinson-White, A. Norman, C. Franck, J.M. Matthews, J.M. Guss, R.J. Payne, T. Passioura, H. Suga & J.P. Mackay. "Cyclic peptides can engage a single binding pocket through highly divergent modes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 26728-26738 (2020).
- 6) Q. Xie, M.M. Wiedmann, A. Zhao, I.R. Pagan, R.P. Novick, H. Suga & T.W. Muir. "Discovery of quorum quenchers targeting the membrane-embedded sensor domain of the *Staphylococcus aureus* receptor histidine kinase, AgrC", *Chem. Commun.*, **56**, 11223-11226 (2020).
- 7) T. Katoh & H. Suga. "Ribosomal Elongation of Aminobenzoic Acid Derivatives", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 16518-16522 (2020).
- 8) Z. Zhang, R. Gao, Q. Hu, H. Peacock, D.M. Peacock, S. Dai, K.M. SHokat & H. Suga. "GTP-State-Selective Cyclic Peptide Ligands of K-Ras(G12D) Block Its Interaction with Raf", *ACS Cent. Sci.*, **6**, 1753–1761 (2020).
- 9) T. Katoh, T. Sengoku, K. Hirata, K. Ogata & H. Suga. "Ribosomal synthesis and de novo discovery of bioactive foldamer peptides containing cyclic beta-amino acids", *Nat. Chem.*, **12**, 1081–1088 (2020).
- 10) A.A. Vinogradov, M. Shimomura, N. Kano, Y. Goto, H. Onaka & H. Suga. "Promiscuous Enzymes Cooperate at the Substrate Level En Route to Lactazole A", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 13886-13897 (2020).
- 11) R. Okuma, T. Kuwahara, T. Yoshikane, M. Watanabe, P. Dranchak, J. Inglese, S. Shuto, Y. Goto & H. Suga. "A Macrocyclic Peptide Library with a Structurally Constrained Cyclopropane-containing Building Block Leads to Thiol-independent Inhibitors of Phosphoglycerate Mutase", *Chem. Asian. J.*, **15**, 2631-2636 (2020).
- 12) D. Hazama, Y. Yin, Y. Murata, M. Matsuda, T. Okamoto, D. Tanaka, N. Terasaka, J. Zhao, M. Sakamoto, Y. Kakuchi, Y. Saito, T. Kotani, Y. Nishimura, A. Nakagawa, H. Suga & T. Matozaki. "Macrocyclic Peptide-Mediated Blockade of the CD47-SIRPalpha Interaction as a Potential Cancer Immunotherapy", *Cell. Chem. Biol.*, **27**, 1181-1191 e7 (2020).
- 13) A.A. Vinogradov, M. Shimomura, Y. Goto, T. Ozaki, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Suga & H. Onaka. "Minimal lactazole scaffold for in vitro thiopeptide bioengineering", *Nat. Commun.*, **11**, 2272 (2020).
- 14) J. Johansen-Leete, T. Passioura, S. Foster, R.P. Bhusal, D. Ford, M. Liu, S.A.K. Jongkees, H. Suga, M.J. Stone & R.J. Payne. "Discovery of Potent Cyclic Sulfopeptide Chemokine Inhibitors via Reprogrammed Genetic Code mRNA Display", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 9141-9146 (2020).
- 15) K. Koike, M. Nagano, M. Ebihara, T. Hirayama, M. Tsuji, H. Suga & H. Nagasawa. "Design, Synthesis, and Conformation-Activity Study of Unnatural Bridged Bicyclic Depsipeptides as Highly Potent Hypoxia Inducible Factor-1 Inhibitors and Antitumor Agents", *J. Med. Chem.*, **63**, 4022-4046 (2020).

- 16) C. Tsiamantas, J.M. Rogers & H. Suga. "Initiating ribosomal peptide synthesis with exotic building blocks", *Chem. Commun.*, **56**, 4265-4272 (2020).
- 17) M.E. Otero-Ramirez, K. Matoba, E. Mihara, T. Passioura, J. Takagi & H. Suga. "Macrocyclic peptides that inhibit Wnt signalling via interaction with Wnt3a", *RSC Chem. Biol.*, **1**, 26-34 (2020).
- 18) S. Ishida, N. Terasaka, T. Katoh & H. Suga. "An aminoacylation ribozyme evolved from a natural tRNA-sensing T-box riboswitch", *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 702-709 (2020).
- 19) T. Katoh & H. Suga. "Ribosomal Elongation of Cyclic gamma-Amino Acids using a Reprogrammed Genetic Code", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 4965-4969 (2020).
- 20) S.R. Fleming, P.M. Himes, S.V. Ghodge, Y. Goto, H. Suga & A.A. Bowers. "Exploring the Post-translational Enzymology of PaaA by mRNA Display", *J. Am. Chem. Soc.*, **142**, 5024-5028 (2020).
- 21) H. Suga, A. Brik, Y. Huang & M. Nawatha. "Affinity Maturation of Macrocyclic Peptide Modulators of Lys48-linked Diubiquitin by a Twofold Strategy", *Chem. Eur. J.*, **26**, 8022-8027 (2020).
- 22) Y. Sakurai, W. Mizumura, K. Ito, K. Iwasaki, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga & H. Harashima. "Improved Stability of siRNA-Loaded Lipid Nanoparticles Prepared with a PEG-Monoacyl Fatty Acid Facilitates Ligand-Mediated siRNA Delivery", *Mol. Pharm.*, **17**, 1397-1404 (2020).
- 23) C. Tsiamantas, S. Kwon, J.M. Rogers, C. Douat, I. Huc & H. Suga. "Ribosomal Incorporation of Aromatic Oligoamides as Peptide Sidechain Appendages", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **59**, 4860-4864 (2020).

## 2. 総説・解説

- 1) A.A. Vinogradov & H. Suga. "Introduction to Thiopeptides: Biological Activity, Biosynthesis, and Strategies for Functional Reprogramming", *Cell. Chem. Biol.*, **27**, 1032-1051 (2020).
- 2) 長野 正展・菅 裕明「ペプチドから「擬天然大環状ペプチド」へのモダリティーの拡張」*有機合成化学協会誌*, **78**, 516-526 (2020).
- 3)

## 3. 著書

- 1) 寺坂 尚紘・菅 裕明「試験管内分子進化法によるバイオマテリアル創成」*核酸科学ハンドブック*, 第 I 部, 第 6 章, 201-208 (2020).

## 4. その他

- 1) 国際公開 WO/2020/080490, 「ペプチドライブラリーの製造方法」, 菅裕明, 後藤佑樹, 阿部郁朗, 岡田正弘, 井上澄香 (国立大学法人東京大学)
- 2) 国際公開 WO2020/050419, 「環状ペプチド」, 菅裕明, Toby Passioura, 伊藤健一郎, 松本邦夫, 酒井克也, 佐藤拓輝 (国立大学法人東京大学, 国立大学法人金沢大学)
- 3) 国際公開 WO2020/067550, 「化合物ライブラリー及び化合物ライブラリーの製造方法」, 菅裕明, 後藤佑樹, 尾仲宏康, ヴィノグラドフアレクサンダー (国立大学法人東京大学)
- 4) 国際公開 WO2020/027224, 「新たな結合特異性を抗体に付与する超汎用法」, 菅裕明, 高木淳一 (国立大学法人東京大学, 国立大学法人大阪大学)