

Annual Research Highlights

(1) “Synthesis of backbone cyclic peptides by the induced peptidyl-tRNA drop-off”

We have developed a new method for the preparation of backbone cyclic peptides using peptidyl-tRNA drop-off. In this method, an mRNA containing His codon (CAC) right after fMet-Cys-Pep-Cys-Pro (Pep=peptide) sequence was translated by reconstituted *E. coli* translation system without histidine. Then, the ribosome would stall at the His codon and induce the drop-off of fMet-Cys-Pep-Cys-Pro-tRNA^{Pro}. At the Cys-Pro-tRNA^{Pro} moiety that contains an ester bond, non-enzymatic N-S acyl shift produces the diketopiperadine thioester. This thioester formation promotes further intramolecular rearrangement involving the thiol group of another Cys to produce a macrothiolactone. Moreover, by generation of the free amino group of the Cys by the enzymatic removal of fMet using peptide deformylase (PDF) and methionine aminopeptidase (MAP), S-N acyl shift occurs to give a backbone cyclic peptide. By using this method, backbone cyclic peptides can be synthesized more easily without the use of a nonproteinogenic glycolic acid for the introduction of an ester bond into the peptide.

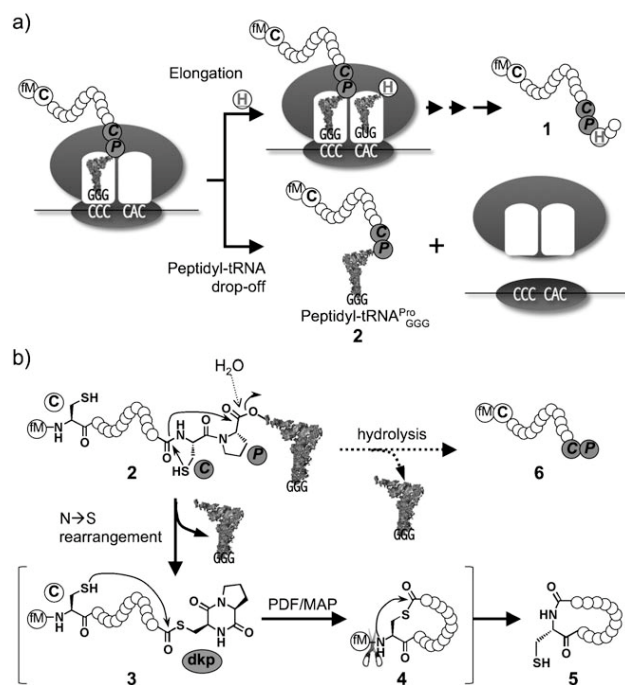


Fig. 1 a) Induced peptidyl-tRNA drop-off from the ribosome, b) Formation of the backbone cyclic peptide by the intramolecular rearrangements of the released peptidyl-tRNA.

Angew. Chem. Int. Ed., **50**, 2159-2161 (2011)

(2) “Ribosomal synthesis of cyclic γ -peptides”

We have developed a new methodology involving genetic code reprogramming to ribosomally express backbone-cyclized peptides containing γ -amino acids. In this methodology, we utilized an artificial translation system, in which AUG start codon and UGU elongation codon are reprogrammed with a dipeptide bearing a γ -amino acid and glycolic acid, respectively. The resulting translation product contains a γ -amino group at the N-terminus and an ester linkage inside the peptide chain. Formation of diketopiperadine at the ester position and the subsequent macrocyclization spontaneously occurred after translation reaction, and the objective cyclic γ -peptides were yielded. Given the fact that both macrocyclic structures and γ -amino acids are often found in bioactive natural products, this methodology is potentially a powerful tool to discover novel bioactive peptides.

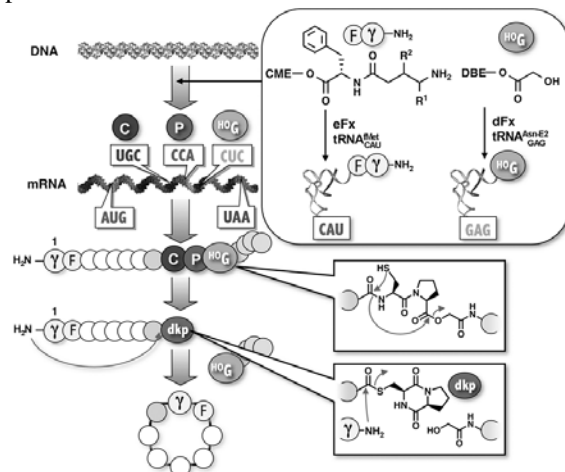


Fig. 2 Outline of the ribosomal synthesis of cyclic γ -peptides.

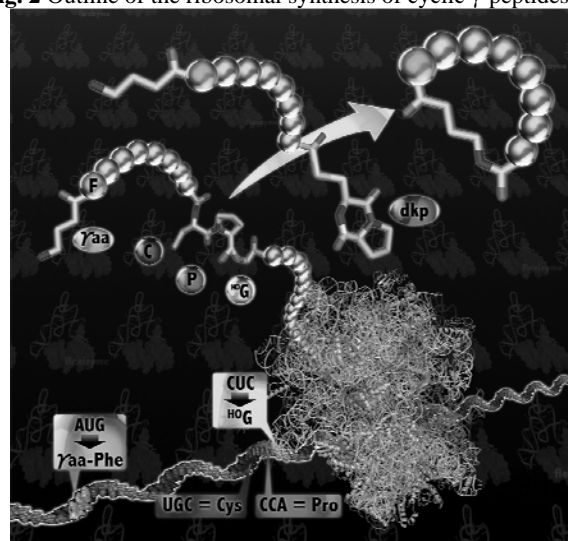


Fig. 3 Cover picture selected by ChemBioChem.

ChemBioChem, **12**, 1183-1187 (2011)

研究ハイライト

(1) ペプチジル tRNA ドロップオフ法による主鎖環状ペプチドの翻訳合成

我々はペプチジル tRNA のドロップオフを利用した主鎖環状ペプチドの合成法を開発した。本手法では、His コドン(CAC)を fMet-Cys-Pep-Cys-Pro 配列 (Pep=ペプチド)の直後に配置した mRNA を His を含まない大腸菌由来再構成無細胞翻訳系を用いて翻訳し、His コドン上でリボソームをストールさせて fMet-Cys-Pep-Cys-Pro-tRNA^{Pro} をドロップオフさせる。そして、エステル結合を含んだ Cys-Pro-tRNA^{Pro} 部分において非酵素的な N-S アシルシフトによりジケトピペラジンチオエステルを形成させ、次にもう一つの Cys のチオール基を介した分子内転位反応により大環状チオラクトンを形成する。さらに N 末端の fMet をペプチド脱ホルミル酵素(PDF)およびメチオニンアミノペプチダーゼ(MAP)により除去することで生じた Cys の遊離アミノ基を介して S-N アシルシフトさせ、ペプチドを主鎖環状化させることができる。この手法では前駆体ペプチドへのエステル結合導入のためにグリコール酸を用いた翻訳を行う必要がないため、より簡便に主鎖環状化を実現できるというメリットがある。

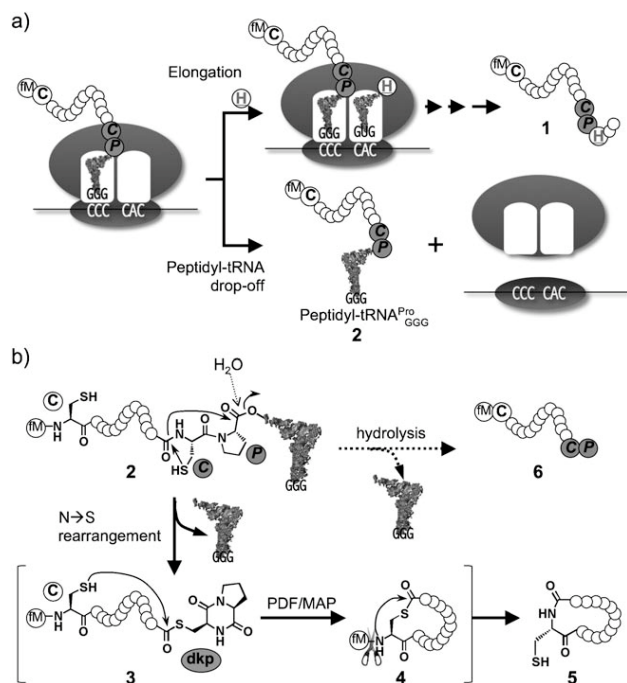


図1 a)リボソームからのペプチジル tRNA のドロップオフ、b)ペプチジル tRNA の分子内転位反応によるペプチドの主鎖環状化

Angew. Chem. Int. Ed., 50, 2159-2161 (2011)

(2) γ -アミノ酸含有主鎖環状ペプチドの翻訳合成

我々は遺伝暗号のリプログラミング技術を応用することで γ -アミノ酸を有する主鎖環状ペプチドの翻訳合成を可能にする新しい手法を開発した。本手法は、AUG 開始コドンに γ -アミノ酸を持つジペプチドで、CUC 伸長コドンをグリコール酸でリプログラミングした人工翻訳系を用いる。この系の翻訳産物は N 末端に γ -アミノ基を、鎖中にエステル結合を有しており、翻訳後にエステル部におけるジケトピペラジン形成・その後の環化反応が自発的に進行することで目的の環状ペプチドが合成される。 γ -アミノ酸及び大環状骨格は天然物に代表される生理活性ペプチドに多く含まれることから、本技術は新規生理活性ペプチドの探索の強力なツールとなり得る。

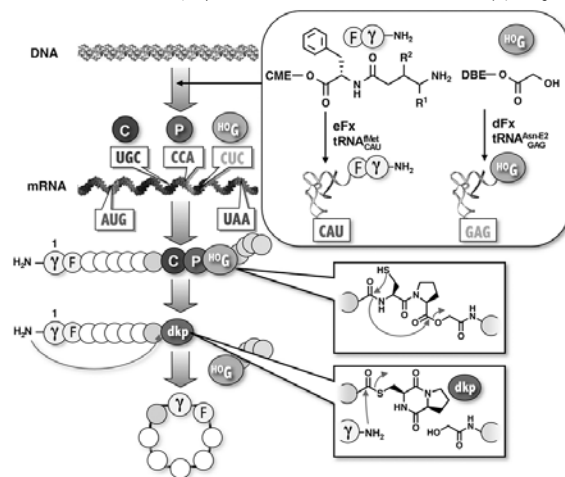


図2 γ -アミノ酸含有主鎖環状ペプチドの翻訳合成を可能とする本技術の概要

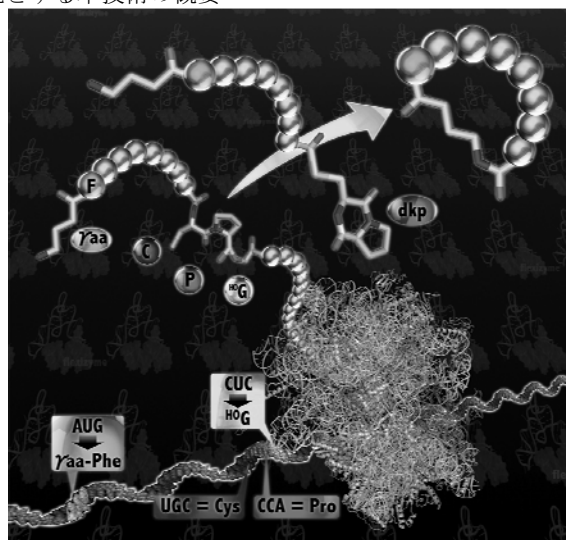


図3 ChemBioChem 誌の表紙を飾ったカバー絵

ChemBioChem, 12, 1183-1187 (2011)

1. 原著論文

- 1) S.B. Pattnaik, K. Jin, K. Futai, H. Suga "Engineering of the redox ribozyme for the determination of its architecture" *Chem. Lett.*, **39**, 786-787 (2010)
- 2) H. Chai, M. Hazawa, N. Shirai, J. Igarashi, K. Takahashi, Y. Hosokawa, H. Suga, I. Kashiwakura "Functional properties of synthetic N-acyl-L-homoserine lactone analogs of quorum-sensing gram-negative bacteria on the growth of human oral squamous carcinoma cells" *Invest. New Drugs*, online ahead of print (2010)
- 3) Yusuke Yamagishi, Hiroaki Suga "Selection of cyclic N-methyl peptide inhibitors against human ubiquitin ligase E6AP using RaPID display" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 57 (2010)
- 4) Yuki Goto, Azusa Hitomi, Hiroshi Murakami, and Hiroaki Suga "New strategies for genetic code reprogramming; dual genetic code and artificial division of codon boxes" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 62 (2010)
- 5) Yuuki Hayashi, Yuhichiro Aoki, Hiroaki Suga "The exploration of the cyclic peptides that can inhibit the activity of Akt2 protein" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 94 (2010)
- 6) Kazuhiro Iwasaki, Kenji Kashiwagi, Takayuki Katoh, Hiroaki Suga "Carcinomas cell imaging by using EpCAM-binding peptides selected from the cyclic non-standard peptide library" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 114 (2010)
- 7) Yukinori Ohshiro, Eiji Nakajima, Yuki Goto, Takashi Kawakami, Atsushi Ohta, Hiroaki Suga "Ribosomal synthesis of γ -amino acid-containing cyclic peptides" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 212 (2010)
- 8) Takashi Higuchi, Hiroaki Suga "RaPID selection of Bcl-2 inhibitors from an alpha-helix non-standard peptide library assisted by an intramolecular bridge" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 215 (2010)
- 9) Jumpei Morimoto, Hiroaki Suga "Accelerating the discovery of nonstandard peptide inhibitors against a deacetylase powered by the RaPID display" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 217 (2010)
- 10) Risa Ito, Yuki Goto, Hiroaki Suga "Discovery of cyclic peptides binding to a cyclophilin powered by the RaPID system" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 244 (2010)
- 11) Kazuki Futai, Tatsuya Watanabe, Hiroaki Suga "Toward creating artificial peptides binding to HCV proteins" *Peptide Science 2010: Proceedings of the Fifth International Peptide Symposium*, 249 (2010)

2. 総説・解説

- 1) G. Hayashi, Y. Goto, H. Suga "Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*" *Chem. Biol.*, **17**, 320-321 (2010).
- 2) 後藤佑樹、伊東利紗、菅裕明 「RaPIDシステムが拓く新創薬戦略」 *MEDCHEMNEWS*, **20**, 26-31 (2010)
- 3) 林剛介、大城幸紀、菅裕明 「特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開」 *生化学*, **82**, 505-514 (2010)
- 4) 菅裕明、山岸祐介、二井一樹 「In vitroセレクション法による人工リボザイムの創製」 *酵素利用技術大系*, 364-369 (2010)
- 5) 菅裕明、樋口岳 「擬天然物特殊ペプチドのプログラム翻訳合成と応用」 *有機合成化学協会誌*, **68**, 217-227 (2010)

3. 著書

該当無し

4. その他

特許

- 1) 菅裕明、村上裕、後藤佑樹「新規人工翻訳合成系」2010年8月27日（審査請求中、PCT 出願予定）、特願2010-270958
- 2) 菅裕明、山岸祐介「N-メチルアミノ酸およびその他の特殊アミノ酸を含む特殊ペプチド化合物ライブラリーの翻訳構築と活性種探索法」2010年9月9日（審査請求中、PCT 出願予定）、特願2010-202012
- 3) 菅裕明、森本淳平「特異的機能低分子化合物含有特殊ペプチド化合物のライブラリーの合成法と活性種探索法」2010年12月3日（審査請求中、PCT 出願予定）、特願2010-270507