

Annual Research Highlights

(1) “Flexizymes for genetic code reprogramming”

Genetic code reprogramming is a method for the reassignment of arbitrary codons from proteinogenic amino acids to non-proteinogenic ones, and thus specific sequences of non-standard peptides can be ribosomally expressed according to their mRNA templates. We have developed a protocol that facilitates the genetic code reprogramming using flexizymes integrated with a custom-made in-vitro translation apparatus, referred to as the flexible in-vitro translation (FIT) system. Flexizymes are flexible tRNA acylation ribozymes that enable the preparation of a diverse array of non-proteinogenic acyl-tRNAs. These acyl-tRNAs read vacant codons created in the FIT system, yielding the desired non-standard peptides with diverse exotic structures, such as N-methyl amino acids, D-amino acids and physiologically stable macrocyclic scaffolds. Facility of the protocol allows for a wide variety of applications in the synthesis of new classes of non-standard peptides with biological functions.

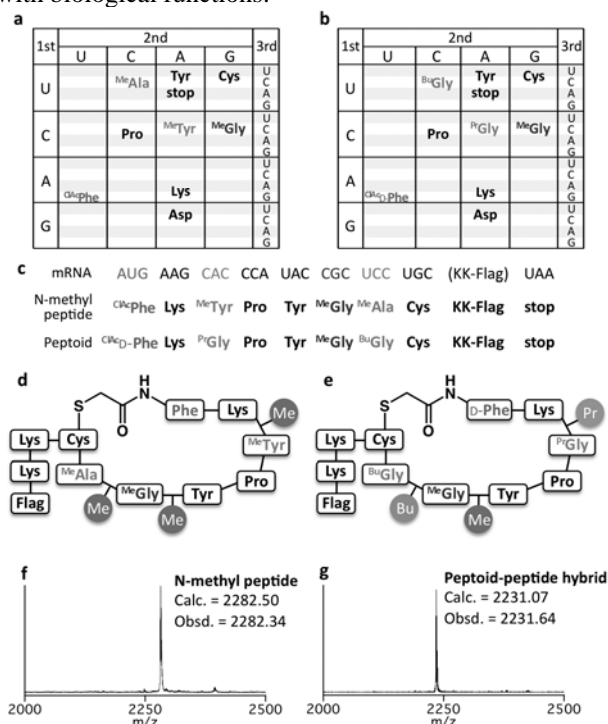


Fig. 1 Ribosomal synthesis of cyclic N-alkyl peptide syntheses by the genetic code reprogramming. (a, b) Reprogrammed genetic code tables used for cyclic N-methyl peptide synthesis (a) and cyclic peptoid-peptide hybrid synthesis (b). (c) Sequences of mRNA template and linear peptide/peptoid translation products. The KK-Flag in parentheses indicates the RNA sequence encoding a KK-Flag peptide (KKDYKDDDDK). (d, e) Schematic structures of cyclic N-methyl-peptide (d) and cyclic peptoid-peptide hybrid (e) synthesized by FIT system via spontaneous posttranslational cyclization. (f, g) MALDI-TOF mass spectra of cyclic N-methyl-peptide (f) and cyclic peptoid-peptide hybrid (g).

1.(1)-3) *Nature Protocols*, **6**, 779-790 (2011)

(2) “Selection of natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase using a ribosome-expressed de novo library”

We have developed a new method for synthesizing a de novo library of natural product-like macrocyclic N-methyl-peptides by ribosomal translation. N-terminus chloroacetyl-D-tryptophan (ClAc^DW) and four N-methyl-amino acids (^{Me}F, ^{Me}S, ^{Me}A, and ^{Me}G) were introduced into the peptide library by using a reprogrammed genetic code. Then, the chloroacetyl group of the ClAc^DW intramolecularly reacted with the sulfhydryl group of the downstream Cys residue to give macrocyclic backbone via a nonreducible thioether bond. By coupling the macrocyclic N-methyl-peptide library with an in vitro display method, which is referred to as RaPID (random nonstandard peptides integrated discovery) system, we have successfully demonstrated the selection of anti-E6AP macrocyclic N-methyl-peptides, all of which have multiple N-methyl amino acids. We confirmed that one of the peptide strongly inhibits polyubiquitination of proteins such as p53. This work demonstrated the potentials of the RaPID system for the discovery of a novel class of biologically active nonstandard peptides.

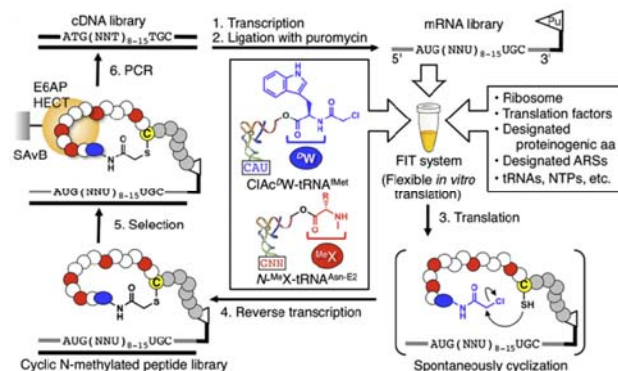


Fig. 2 Overview of the RaPID system for the selection of macrocyclic N-methyl-peptides against E6AP.

Clone	Random region															S	
	Ac ^D W	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄		X ₁₅
CM ₁₁ -1 (15/47)	C	D	V	^{Me} S	G	R	^{Me} F	^{Me} G	Y	^{Me} F	P
CM ₁₁ -2 (1/47)	C	D	V	^{Me} S	G	R	^{Me} F	^{Me} G	Y	^{Me} G	P
CM ₁₁ -3 (6/47)	C	D	V	^{Me} S	H	Y	^{Me} F	P	Y	^{Me} F	P
CM ₁₁ -4 (5/47)	C	H	S	^{Me} S	G	H	^{Me} F	R	Y	^{Me} F	P
CM ₁₁ -5 (7/47)	C	S	N	^{Me} A	G	H	^{Me} F	P	Y	^{Me} F	P
CM ₁₁ -6 (1/47)	C	H	N	^{Me} A	G	H	^{Me} F	S	Y	^{Me} F	P
CM ₁₃ -7 (1/47)	C	D	V	^{Me} S	G	R	^{Me} F	S	Y	^{Me} F	P	R	^{Me} A
CM ₁₃ -8 (11/47)	S	R	P	V	T	C	^{Me} G	Y	R	Y	^{Me} F	^{Me} G

Fig. 3 Peptide sequences obtained from the in vitro selection.

1.(1)-1) *Chemistry & Biology*, **18**, 1562-1570 (2011)

研究ハイライト

(1) フレキシザイムを用いた遺伝暗号のリプログラミング

遺伝暗号のリプログラミング法は、翻訳反応におけるコドンとアミノ酸の対応関係を人工的に改変することで、複数の非タンパク質性アミノ酸を含む特殊ペプチドを自在に生合成する手法である。我々はアミノアシル化を触媒する人工リボザイムであるフレキシザイムと、再構成型の無細胞翻訳系とを組み合わせることで、簡便に遺伝暗号のリプログラミングを実施可能なフレキシブル翻訳系 (FIT システム) を確立した。この手法は天然物ライクな特殊骨格 (N-メチルアミノ酸・D-アミノ酸・大環状骨格など) を有するペプチドを正確かつ迅速に合成することができるため、生理活性を持った新規特殊ペプチドの探索への応用が期待される。

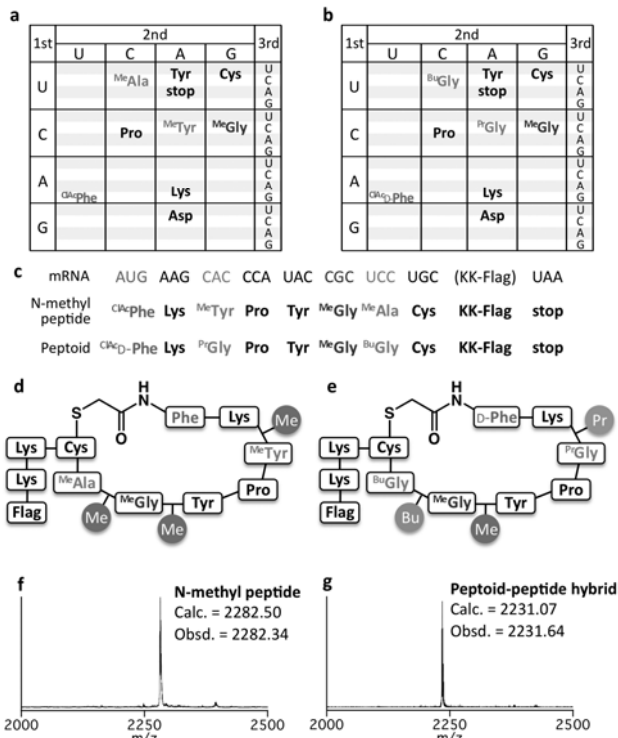


図1 遺伝暗号のリプログラミングによる環状 N-アルキルペプチドの翻訳合成。(a, b) (a)環状 N-メチルペプチド及び(b)環状ペプチド-ペプチドハイブリッドの翻訳に用いた改変遺伝暗号。(c) 用いた mRNA 配列及び翻訳産物の配列。括弧の中の「KK-Flag」は KK-Flag ペプチド (KKDYKDDDDK) をコードする RNA 配列を意味する。(d, e) FIT システムと翻訳後自発的環状化反応により合成した (d)環状 N-メチルペプチド及び(e)環状ペプチド-ペプチドハイブリッドの構造。(f, g) 得られた(f)環状 N-メチルペプチド及び(g)環状ペプチド-ペプチドハイブリッドの MALDI-TOF マススペクトル。

1.(1)-3) *Nature Protocols*, **6**, 779-790 (2011)

(2) リボソーム翻訳合成による擬天然物型大環状 N-メチルペプチドライブラリーを用いた新規ユビキチンライゲース阻害剤の探索

当研究室では、リボソーム翻訳合成による擬天然物型 N-メチル大環状ペプチドライブラリーの合成法を確立した。遺伝暗号リプログラミングによりペプチド鎖の N 末端にクロロアセチル-D-トリプトファン (ClAc^DW) を、その下流に 4 種類の N-メチルアミノ酸 (MeF, MeS, MeA, MeG) を導入し、クロロアセチル基と下流のシステインのスルフヒドリル基との間でチオエーテル結合を形成することによって大環状骨格を形成させることができる。さらに、この N-メチル大環状ペプチドライブラリーと *in vitro* ディスプレイ法を組み合わせる手法として RaPID (random nonstandard peptides integrated discovery) システムを開発し、これを用いてユビキチンライゲース E6AP を標的とした阻害剤ペプチドの探索に成功した。得られたペプチドは全て複数の N-メチルアミノ酸を含んでおり、そのうちの 1 つのペプチドについて非常に強い阻害活性を有することが確認された。この成果により、RaPID システムが新規生理活性ペプチドを探索する手法として非常に有効であることを示した。

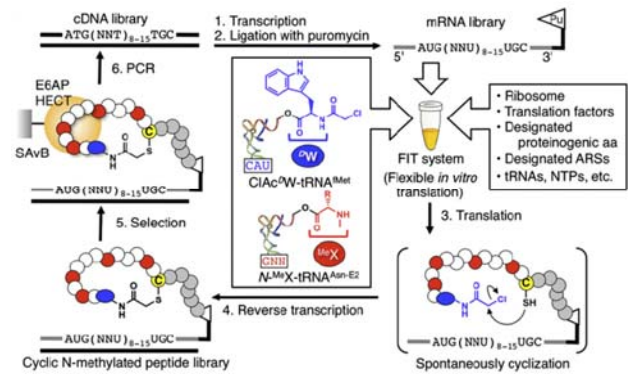


図2 RaPID システムによる E6AP 阻害剤大環状 N-メチルペプチドのセレクション

Clone	Random region																
	Ac ^D W	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆ (GS) ₂
CM ₁₁ -1 (15/47)	C	D	V	MeS	G	R	MeF	MeG	Y	MeF	P
CM ₁₁ -2 (1/47)	C	D	V	MeS	G	R	MeF	MeG	Y	MeF	P
CM ₁₁ -3 (6/47)	C	D	V	MeS	H	Y	MeF	P	Y	MeF	P
CM ₁₁ -4 (5/47)	C	H	S	MeS	G	H	MeF	R	Y	MeF	P
CM ₁₁ -5 (7/47)	C	S	N	MeA	G	H	MeF	P	Y	MeF	P
CM ₁₁ -6 (1/47)	C	H	N	MeA	G	H	MeF	S	Y	MeF	P
CM ₁₃ -7 (1/47)	C	D	V	MeS	G	R	MeF	S	Y	MeF	P	R	MeA
CM ₁₃ -8 (11/47)	S	R	P	V	T	C	MeG	Y	R	Y	Y	MeF	MeG

図3 *in vitro* セレクションによって得られたペプチドの配列

1.(1)-1) *Chemistry & Biology*, **18**, 1562-1570 (2011)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga* "Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library" *Chemistry & Biology*, **18**, 1562-1570 (2011)
- 2) J. Chung, E. Goo, S. Yu, O. Choi, J. Lee, J. Kim, H. Kim, J. Igarashi, H. Suga, J.S. Moon, I. Hwang, S. Rhee "Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 12089-12094 (2011)
- 3) Y. Goto, T. Katoh, H. Suga* "Flexizymes for genetic code reprogramming" *Nature Protocols*, **6**, 779-790 (2011)
- 4) M. Yamamura, N. Kano, T. Kawashima* "Formation of a Cyclic Bis(iminophosphorane) from a 2,2'-Bis(phosphino)azobenzene via N=N Bond Cleavage" *Heteroatom Chemistry*, **22**, 301-306 (2011)
- 4) H. Miyake, N. Kano,* T. Kawashima* "Isolation of a Metastable Geometrical Isomer of a Hexacoordinated Dihydrophosphate: Elucidation of Its Enhanced Reactivity in Umpolung of a Hydrogen Atom of Water" *Inorganic Chemistry*, **50**, 9083-9089 (2011)
- 5) T.J. Kang, H. Suga* "Translation of a histone H3 tail as a model system for studying peptidyl-tRNA drop-off" *FEBS Letters*, **585**, 2269-2274 (2011)
- 6) K. Öjemalm, T. Higuchi, Y. Jiang, Ü. Langel, I. Nilsson, S.H. White, H. Suga*, G. von Heijne* "Apolar surface area determines the efficiency of translocon-mediated membrane-protein integration into the endoplasmic reticulum" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, E359-364 (2011)
- 7) Y. Ohshiro, E. Nakajima, Y. Goto, S. Fuse, T. Takahashi, T. Doi, H. Suga* "Ribosomal Synthesis of Backbone-Macrocyclic Peptides Containing γ -Amino Acids" *ChemBioChem*, **12**, 1183-1187 (2011)
- 8) T.J. Kang, Y. Hayashi, H. Suga* "Synthesis of the backbone cyclic peptide sunflower trypsin inhibitor-1 promoted by the induced peptidyl-tRNA drop-off" *Angewandte Chemie International Edition*, **50**, 2159-2161 (2011)
- 9) J. Igarashi, H. Suga* "Custom synthesis of autoinducers and their analogues" *Methods in molecular biology*, **692**, 265-274 (2011)

2. 総説・解説

- 1) H. Suga*, G. Hayashi, N. Terasaka "The RNA origin of transfer RNA aminoacylation and beyond" *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **366**, 2959-2964 (2011)
- 2) T. Katoh, Y. Goto, M.S. Reza, H. Suga* "Ribosomal synthesis of backbone macrocyclic peptides" *Chemical Communications*, **47**, 9946-9958 (2011)

3) J. Morimoto, Y. Hayashi, K. Iwasaki, H. Suga* "Flexizymes: their evolutionary history and the origin of catalytic function" *Accounts of Chemical Research*, **44**, 1359-1368 (2011)

4) 樋口岳・菅裕明「新たな創薬への道を開く stapled peptide」*化学* **66**, 55-58 (2011)

5) 下舞大・後藤佑樹・菅裕明「ペプチド医薬品開発の新基盤技術“RaPIDシステム”」*化学工業* **62**, 109-115 (2011)

6) 山口淳・加藤敬行・菅裕明「遺伝暗号のリプログラミングを用いた特殊ペプチド創薬」*Drug Delivery System*, **26**, 584-592 (2011)

3. 著書

1) H. Suga, K. Futai, K. Jin "Metal ion requirements in artificial ribozymes that catalyze aminoacylation and redox reactions" *Structural and Catalytic Roles of Metal Ions in RNA, Metal ions in life sciences (Wiley & Sons. Ltd.)*, 277-297 (2011)

2) 後藤佑樹・菅裕明「論文にみる最重要概念と革新実験データ」*核酸化学のニュートレンド DNA・RNA の新たな可能性を拓く(日本化学会編)*, 32-35, (2011)

4. その他

1) 菅裕明・後藤佑樹・伊藤悠美「アズリン化合物及びアズール化合物のライブラリー、並びにその製造方法」
2011年3月9日出願、特願 2011-52219、PCT 出願 PCT/JP2012/056181