

Annual Research Highlights

(1) “Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo.”

Goadsporin is a member of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs), containing an N-terminal acetyl moiety, six azoles and two dehydroalanines in the peptidic main chain. Although the enzymes involved in goadsporin biosynthesis have been defined, the principle of how the respective enzymes control the specific modifications remains elusive. Here we report in vitro synthesis of goadsporin using the enzymes reconstituted in the flexible in vitro translation system, referred to as the FIT-GS system. In this system, precursor peptides expressed from synthetic DNA templates undergoes multistep posttranslational modifications in a one-pot fashion to construct characteristic structures found in goadsporin. This system allows us to readily prepare not only the naturally occurring goadsporin but also 52 mutants, enabling us to dissect the modification determinants of the precursor peptide for each enzyme. The in vitro knowledge has led us to design artificial precursor peptides that could be efficiently processed by the biosynthetic enzymes and result in designer goadsporin analogs with artificial sequences. The goadsporin analogs could also be produced by a heterologous expression system using artificially mutated precursor genes, demonstrating that the in vitro knowledge of biosynthetic enzymes were applicable to in vivo environment and allowed for mass production of the designer goadsporin analogs. This study has revealed that goadsporin would be an attractive scaffold to generate pseudo-natural products for antibiotic or even other activities. The strategy demonstrated in this report is in principle applicable to various other RiPP enzymes, enabling us to rapidly investigate the principle of modification events with great ease and facilitating the production of not only native secondary metabolites but also designer molecules.

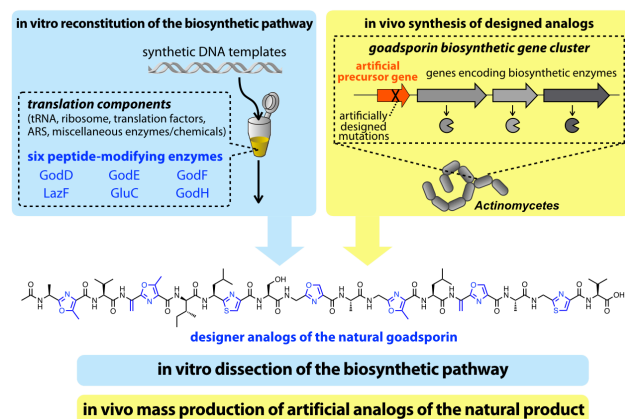


Fig. 1 In vitro/vivo biosynthesis of designer goadsporin analogs.

1.(1)-8) *Nat. Commun.*, **8**, 14207 (2017).

(2) “Ribosomal incorporation of consecutive D-amino acids into peptides.”

In nature, the ribosomal translation system exclusively utilizes the twenty proteinogenic amino acids for synthesizing polypeptides. However, a reconstituted cell-free translation system in combination with an artificially reprogrammed genetic code enables incorporation of various non-proteinogenic amino acids into peptides. For example, *N*-methyl- α -amino acids, *N*-alkyl- α -amino acids, β -amino acids, and D-amino acids have been successfully introduced into peptides to date. Nevertheless, consecutive incorporation of D-amino acids has been still extremely difficult, which is attributed to mainly the following two reasons; 1) slow accommodation of D-aminoacyl-tRNA onto ribosomal A site, and 2) slow peptidyl transfer between the P-site peptidyl-D-aminoacyl-tRNA and the A-site D-aminoacyl-tRNA.

Here we report consecutive D-amino acid elongation by means of engineered tRNAs and optimized concentrations of translation factors. tRNA^{GluE2} has higher binding affinity to EF-Tu than our conventional tRNA^{AsnE2}, and therefore accommodation of D-aminoacyl-tRNA^{GluE2} was improved. We also developed another engineered tRNA, named tRNA^{Pro1E2}, bearing the T-stem motif of tRNA^{GluE2} and the D-arm motif of *E. coli* tRNA^{Pro1} for tighter binding to EF-Tu and EF-P, respectively (Fig. 2). EF-P is a bacterial translation factor that accelerates peptide bond formation between consecutive Pro in the endogenous translation system. We showed that consecutive incorporation of D-amino acids and an α,α -disubstituted amino acid can be promoted by EF-P depending on the D-arm motif of tRNA^{Pro1E2}.

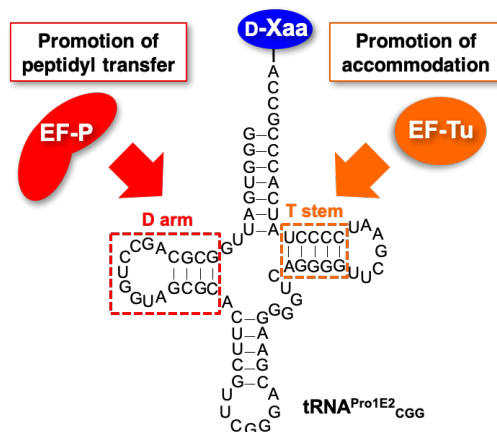


Fig. 2 Construct of an engineered tRNA, tRNA^{Pro1E2}, designed for efficient D-amino-acid incorporation.

1-(1)-5) *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12601 (2017).

1-(1)-6) *Cell Chem. Biol.*, **24**, 46 (2017).

研究ハイライト

(1) 試験管内再構成によるゴードスポリン生合成経路の解析が擬天然ペプチド誘導体の *in vivo* 生産を可能にする

ゴードスポリンは、翻訳後修飾により生産されるペプチド系天然物 (RiPPs) の一種であり、N 末端アセチル化、6ヶ所のアゾール骨格、2ヶ所の脱水アミノ酸など、高度な構造修飾を有する。ゴードスポリンの生合成に関わる酵素はこれまでに同定されていたものの、各酵素がどのように基質である前駆体ペプチドを認識して骨格変換反応を行うかは明らかになっていなかった。そこで本研究では、ゴードスポリンの生合成に関わる翻訳後修飾酵素群を再構成し、人工翻訳系と組み合わせた試験管内生合成系「FIT-GS システム」を構築した。本システムでは、合成 DNA 鋳型から発現された前駆体ペプチドが同一容器内で多段階の翻訳後修飾を受けることで、ゴードスポリンに見られる特徴的な骨格を形成することができる。実際に、天然型のゴードスポリンだけでなく、52 種類の非天然型誘導体も生産することができ、これにより各酵素によって修飾されるための前駆体ペプチド上の配列要件が明らかになった。この知見を基に前駆体ペプチド配列を巧みに設計することで、人工ゴードスポリン誘導体を試験管内生合成できることも実証した。さらに、当該人工誘導体は異種発現法により生体内で生産できることも実証し、試験管内で得た生合成知見を生体内環境でも活用できることを確認すると共に、mg オーダーの人工誘導体の簡便生産にも成功した。無細胞人工翻訳系を利用した多様な基質供給は、他の RiPPs 生合成系にも適用可能であり、様々な生合成酵素を利用した天然・非天然ペプチドの創製が今後期待される。

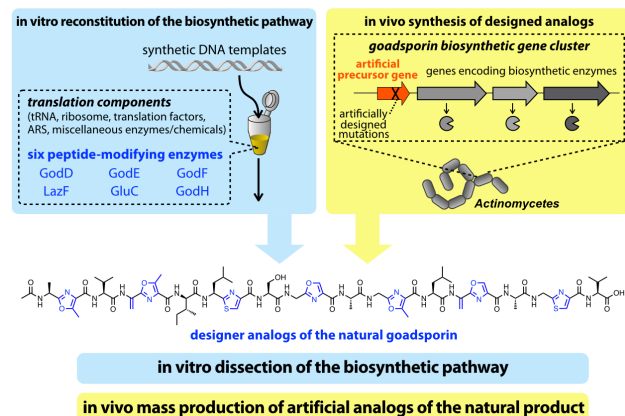


図 1 ゴードスポリンの人工誘導体の試験管内および生体内生合成。

1.(1)-8) *Nat. Commun.*, **8**, 14207 (2017).

(2) リボソーム翻訳による D-アミノ酸のペプチド鎖中への連続導入

天然のリボソーム翻訳系においては、20 種類のタンパク質性アミノ酸のみがポリペプチド合成の基質として利用される。一方で、再構成無細胞翻訳系を用いて遺伝暗号をリプログラミングすることにより、様々な非タンパク質性アミノ酸がペプチド鎖中に導入できることも知られており、例えば、N-メチル- α -アミノ酸、N-アルキル- α -アミノ酸、 β -アミノ酸、D-アミノ酸等の導入が報告されている。しかしながら、そのような手法を用いても D-アミノ酸を 2 つ以上連続して導入することは依然として非常に困難であった。その主な理由としては、(1)D-アミノアシル tRNA のリボソーム A サイトへのアコモデーションが遅いこと、(2)リボソーム上での D-アミノ酸間のペプチド鎖転移反応が遅いことが挙げられる。

今回我々は、これらの問題点を解決するために新しい人工 tRNA を開発し、D-アミノ酸を効率よく連続導入することに成功した。tRNA^{GluE2} は EF-Tu との結合力を高めた tRNA であり、これにより D-アミノアシル-tRNA^{GluE2} のアコモデーションが促進された。また、tRNA^{Pro1E2} は tRNA^{GluE2} 由来の T ステム構造と、tRNA^{Pro1} 由来の D アーム構造をもち、EF-Tu および EF-P との結合力を高めたものである (図 2)。EF-P は翻訳因子の一つであり、連続するプロリン間のペプチド結合形成を促進することが知られている。ここでは、EF-P が D-アミノアシル-tRNA^{Pro1E2} の D アーム構造を認識してペプチド結合形成を促進することを示した。

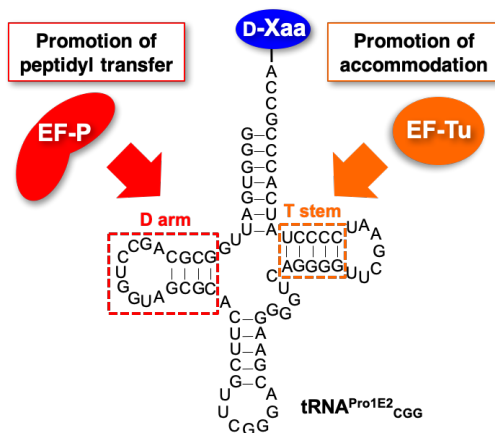


図 2 D-アミノ酸の導入効率向上を図るために設計された人工 tRNA (tRNA^{Pro1E2})

1-(1)-5) *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12601 (2017).

1-(1)-6) *Cell Chem. Biol.*, **24**, 46 (2017).

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) T. Amoh, K. Murakami, R. Kariyama, K. Hori, Y. Irie, D. Viducic, K. Hirota, J. Igarashi, H. Suga, H. Kumon, *et al.*, "A *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing autoinducer analog enhances the activity of antibiotics against resistant strains", *J. Med. Invest.*, **64**, 101 (2017).
- 2) E.M. Danhart, M. Bakhtina, W.A. Cantara, A.B. Kuzmishin, X. Ma, B.L. Sanford, O. Vargas-Rodriguez, M. Kosutic, Y. Goto, H. Suga, *et al.*, "Conformational and chemical selection by a trans-acting editing domain", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E6774 (2017).
- 3) D.W. Hwang, N. Bahng, K. Ito, S. Ha, M.Y. Kim, E. Lee, H. Suga, D.S. Lee, "In vivo targeting of c-Met using a non-standard macrocyclic peptide in gastric carcinoma", *Cancer Lett.*, **385**, 144 (2017).
- 4) S.A.K. Jongkees, S. Caner, C. Tysoe, G.D. Brayer, S.G. Withers, H. Suga, "Rapid Discovery of Potent and Selective Glycosidase-Inhibiting De Novo Peptides", *Cell Chem. Biol.*, **24**, 381 (2017).
- 5) T. Katoh, Y. Iwane, H. Suga, "Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation", *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12601 (2017).
- 6) T. Katoh, K. Tajima, H. Suga, "Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation", *Cell Chem. Biol.*, **24**, 46 (2017).
- 7) A. Kawamura, M. Munzel, T. Kojima, C. Yapp, B. Bhushan, Y. Goto, A. Tumber, T. Katoh, O.N. King, T. Passioura, *et al.*, "Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides", *Nat. Commun.*, **8**, 14773 (2017).
- 8) T. Ozaki, K. Yamashita, Y. Goto, M. Shimomura, S. Hayashi, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Ikeda, H. Suga, H. Onaka, "Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo", *Nat. Commun.*, **8**, 14207 (2017).
- 9) Y. Sakurai, W. Mizumura, M. Murata, T. Hada, S. Yamamoto, K. Ito, K. Iwasaki, T. Katoh, Y. Goto, A. Takagi, *et al.*, "Efficient siRNA Delivery by Lipid Nanoparticles Modified with a Nonstandard Macrocyclic Peptide for EpCAM-Targeting", *Mol. Pharm.*, **14**, 3290 (2017).
- 10) B.S. Shin, T. Katoh, E. Gutierrez, J.R. Kim, H. Suga, T.E. Dever, "Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis", *Nucleic Acids Res.*, **45**, 8392 (2017).
- 11) X. Song, L.Y. Lu, T. Passioura, H. Suga, "Macrocyclic peptide inhibitors for the protein-protein interaction of Zaire Ebola virus protein 24 and karyopherin alpha 5", *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5155 (2017).
- 12) H. Yu, P. Dranchak, Z. Li, R. MacArthur, M.S. Munson, N. Mehzabeen, N.J. Baird, K.P. Battalio, D. Ross, S. Lovell, *et al.*, "Macrocyclic peptides delineate locked-open inhibition mechanism for microorganism phosphoglycerate mutases", *Nat. Commun.*, **8**, 14932 (2017).

2. 総説・解説

- 1) R. Obexer, L.J. Walport, H. Suga, "Exploring sequence space: harnessing chemical and biological diversity towards new peptide leads", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **38**, 52 (2017).
- 2) T. Passioura, H. Suga, "A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets", *Chemical communications*, **53**, 1931 (2017).
- 3) L.J. Walport, R. Obexer, H. Suga, "Strategies for transitioning macrocyclic peptides to cell-permeable drug leads", *Curr Opin Biotechnol*, **48**, 242 (2017).

3. 著書

- 1) T. Passioura; Y. Goto; T. Katoh; H. Suga, "Biological synthesis and affinity-based selection of small macrocyclic peptide ligands " Cyclic peptides, RSC Publishing, Wiley-VCH, 225-254, (2017)
- 2) 黒田知宏・後藤佑樹・菅裕明「遺伝暗号リプログラミングによる人工翻訳系の創製」人工細胞の創製とその応用, シーエムシー出版 P162-P171 (2017).

4. その他

- 1) 菅 裕明, Hao Yu, イングリース ジェイムズ, カーロウ クロティルド, ドランチャク パトリシア, マッカーサー ライアン, リ ジル「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」PCT/US2017/046228
- 2) 菅 裕明, 高木 淳一「環状ペプチドをタンパク質構造に提示させる超汎用法」特願 2017-148622

- 3) 菅 裕明, 加藤 敬行「D-アミノ酸の取り込みを増強する tRNA の D 及び T アームの改変」特願 2017-200356
- 4) 変わる新薬開発「東大教授 菅裕明さんに聞く」中日新聞、2017. 10. 12.
- 5) ティーブレイク「「異端」のススメ」、読売新聞、2017. 10. 1.
- 6) 次世代の先導者「東京大学准教授 後藤 佑樹氏 (36)」日経産業新聞、2017. 10. 5.