

Annual Research Highlights

(1) “Ribosomal incorporation of consecutive β -amino acids”

In the endogenous ribosomal translation system, only the twenty canonical L- α -amino acids are exclusively utilized for polypeptide synthesis. However, natural bioactive peptides often contain various β -amino acids in their structure. It has been reported that β -amino acids induce unique helical structures of peptides, such as 10-, 12-, and 14-helices, which are generally more stable than α -helix. β -amino acids also induce specific turn structures like pseudo- γ -turn. Due to such unique characteristics, peptides containing consecutive β -amino acids are an attractive platform for discovery of novel peptide drugs and nanomaterials.

By using a reconstituted ribosomal translation system in combination with the genetic code reprogramming technology, incorporation of single or non-consecutive β -amino acids into peptides has previously been accomplished; however, consecutive incorporation of β -amino acids has been still a formidable challenge. This is mainly due to the slow accommodation of β -aminoacyl-tRNA on to the ribosomal A site, and slow peptidyl transfer between β -amino acids.

Here, in order to overcome these issues, we took advantage of an engineered tRNA, tRNA^{Pro1E2}, bearing optimized T-stem and D-arm motifs for enhancing binding affinity to EF-Tu and EF-P, respectively. The improved binding affinity of EF-Tu contributes to efficient accommodation of β -aminoacyl-tRNA^{Pro1E2}, whereas EF-P accelerates peptidyl transfer between β -amino acids. As a result, we succeeded in introducing up to seven consecutive β -amino acids into model peptides. Furthermore, we also synthesized macrocyclic peptides containing consecutive β -amino acids closed by a thioether bond between two D- α -amino acids (Fig. 1). These were the first demonstration of the ribosomal synthesis of peptides containing consecutive β -amino acids.

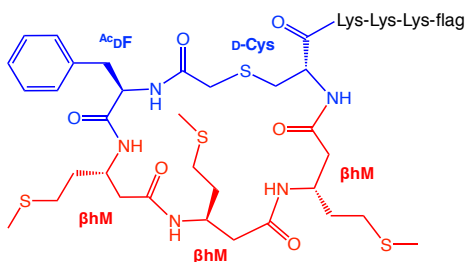


Fig. 1 Structure of a ribosomally synthesized macrocyclic peptide containing three consecutive β -amino acids closed by two D- α -amino acids.

1.(1)-6) *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 12159 (2018).

(2) “Ribosomal synthesis and folding of peptide-helical aromatic foldamer hybrids”

In the endogenous translation, the mRNA-templated synthesis of peptides by the ribosome, only the twenty proteinogenic L- α -amino acids are utilized. Genetic code reprogramming, which reassigns new amino acids to the codons using reconstituted *in vitro* translation, enables to incorporate various non-proteinogenic amino acids into peptides such as D- α -amino acids, β -amino acids and so on. Integration of genetic code reprogramming and *in vitro* evolution methodology like mRNA display has developed non-natural peptides bearing high resistance to proteolytic degradation, cell penetration capabilities or protein recognition through the folding of short sequences. The further expansion of the range of chemical entities that can be utilized by translation may accelerate the discovery of functional molecules.

Here, we showed that the ribosome accepts helical aromatic oligomer, called foldamers, at the N terminus of translated peptides. The translation process was found to require foldamer unfolding to pass the ribosome exit tunnel. Once the translation was completed, foldamers formed helical structures. The folding propensity of these foldamers largely exceeded that of short peptides, and their incorporation encoded additional folding information that can effectively control the peptide structure. For example, we showed that macrocycles can be translated by the ribosome, whereby a foldamer segment adopts a helical conformation and forces a peptide segment to remain extended. These results expanded the scope of chemicals utilized in the ribosomal expression of mRNA-encoded sequences, and also showed the benefits of using the stable conformations of foldamers to control peptide conformation.

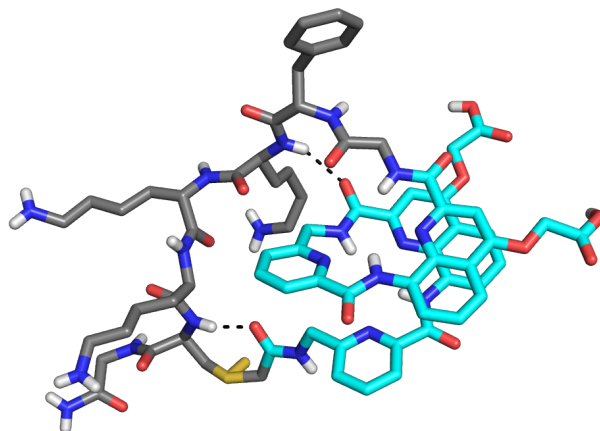


Fig. 2 Crystal structure of the macrocyclic peptide-foldamer hybrid synthesized by ribosomal translation. The peptide segment (gray) was stretched by the helical aromatic foldamer segment (cyan).

2.(1)-15) *Nat. Chem.*, **10**, 405 (2018)

研究ハイライト

(1) リボソーム翻訳によるβ-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通常20種類のL-α-アミノ酸のみがポリペプチド合成の基質として用いられている。一方で、天然の生理活性ペプチドの中にはβ-アミノ酸を含むものも多数知られている。β-アミノ酸は、α-ヘリックスよりも安定な10-ヘリックス、12-ヘリックス、14-ヘリックスといったヘリックス構造を誘起するほか、pseudo-γ-turnのようなターン構造を誘起しうることも知られている。このような特徴から、β-アミノ酸を含むペプチドは新規ペプチド医薬やナノ材料を開発するためのプラットフォームとして魅力的である。

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β-アミノ酸をペプチド鎖中に導入できることは知られているが、2つ以上連続で導入することは非常に困難であり、これまでに達成された事例はなかった。その原因として、(1)β-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β-アミノ酸間のペプチド鎖転移反応が遅いことが考えられる。そこで、我々はtRNA^{ProIE2}と呼ばれる人工tRNAを用い、β-アミノ酸の連続導入を目指した。tRNA^{ProIE2}はEF-Tuに強く結合するTステム構造と、EF-Pに結合するDアーム構造をもち、β-アミノアシル tRNAのアコモデーションとペプチド鎖転移反応を促進することができる。これにより、我々はβ-アミノ酸を最大で7連続で導入することに成功した。また、3連続でβ-アミノ酸を含み、かつ2つのD-α-アミノ酸間のチオエーテル結合により大環状化されたペプチドの翻訳合成にも成功した(図1)。これらは、リボソームによりβ-アミノ酸を連続導入した初めての事例である。

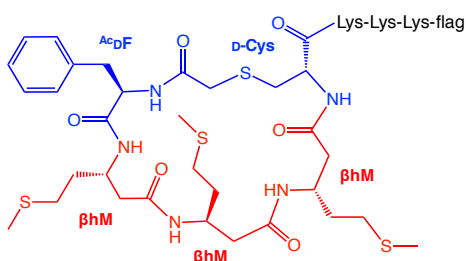


図1 3連続でβ-アミノ酸を含むモデルペプチドの構造。2つのD-α-アミノ酸間のチオエーテル結合により大環状化されている。

1.(1)-6) *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 12159 (2018).

(2) 芳香性ヘリックスフォルダマー含有ペプチドのリボソーム翻訳合成

天然のポリペプチド合成系であるリボソーム翻訳系では、20種類のL-α-アミノ酸が基質として用いられている。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で、D-α-アミノ酸やβ-アミノ酸などの様々な非タンパク質性アミノ酸をペプチドへ翻訳導入することが可能になっている。さらに試験管内分子進化法と組み合わせることで、プロテアーゼ耐性や細胞膜透過性、特定のタンパク質への結合能を持つような高機能性ペプチドが開発されている。翻訳合成できる分子の多様性をさらに増やすことで、さらなる高機能性分子の開発が加速することが期待される。

今回我々は、アミノ酸より分子量が非常に大きく、強固な人工ヘリックス構造を形成する芳香性オリゴマー(フォルダマー)を、ペプチドのN末端に翻訳導入することに成功した。翻訳新生鎖の通り道であるリボソーム出口トンネル内では、フォルダマーはヘリックス構造を形成せずに引き延ばされ、翻訳終了後にヘリックス構造を形成する。さらに我々が開発したペプチド大環状化手法と組み合わせることで、フォルダマーを含有する大環状ペプチドの翻訳合成に成功した(図2)。フォルダマーがペプチドと比較して強固なヘリックス構造を取るため、ペプチド部分は引き延ばされた構造が誘起されている。本研究結果はリボソーム翻訳に用いることができる基質の多様性を拡張し、さらにフォルダマー構造によってペプチドの構造を制御する新たな方法を示した。

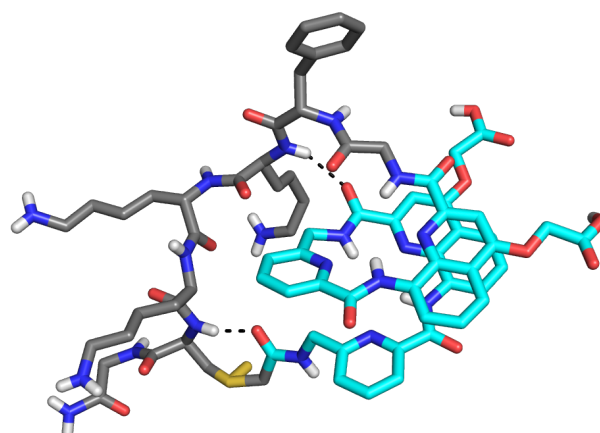


図2 翻訳合成に成功したフォルダマー含有環状ペプチドの結晶構造。フォルダマー(青色)の強固なヘリックス構造によってペプチドの構造(灰色)が引き延ばされている。

2.(1)-15) *Nat. Chem.*, **10**, 405 (2018)

1. 原著論文

(1) Refereed Journals

- 1) J.M. Bacusmo, A.B. Kuzmishin, W.A. Cantara, Y. Goto, H. Suga, K. Musier-Forsyth, "Quality control by trans-editing factor prevents global mistranslation of non-protein amino acid alpha-aminobutyrate", *RNA Biol.*, **15**, 576 (2018).
- 2) N.K. Bashiruddin, Y. Matsunaga, M. Nagano, J. Takagi, H. Suga, "Facile Synthesis of Dimeric Thioether-Macrocyclic Peptides with Antibody-like Affinity against Plexin-B1", *Bioconjug. Chem.*, **29**, 1847 (2018).
- 3) K.W. Decoene, W. Vannecke, T. Passioura, H. Suga, A. Madder, "Pyrrole-Mediated Peptide Cyclization Identified through Genetically Reprogrammed Peptide Synthesis", *Biomedicines*, **6**, (2018).
- 4) Y. Iwane, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, "Artificial Division of Codon Boxes for Expansion of the Amino Acid Repertoire of Ribosomal Polypeptide Synthesis", *Methods Mol. Biol.*, **1728**, 17 (2018).
- 5) T. Katoh, Y. Iwane, H. Suga, "tRNA engineering for manipulating genetic code", *RNA Biol.*, **15**, 453 (2018).
- 6) T. Katoh, H. Suga, "Ribosomal Incorporation of Consecutive β -Amino Acids", *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 12159 (2018).
- 7) T. Kusakizako, Y. Tanaka, C.J. Hipolito, H. Suga, O. Nureki, "Crystallographic Analysis of MATE-Type Multidrug Exporter with Its Inhibitors", *Methods Mol. Biol.*, **1700**, 37 (2018).
- 8) T.E. McAllister, T.L. Yeh, M.I. Abboud, I.K.H. Leung, E.S. Hookway, O.N.F. King, B. Bhushan, S.T. Williams, R.J. Hopkinson, M. Munzel, *et al.*, "Non-competitive cyclic peptides for targeting enzyme-substrate complexes", *Chem. Sci.*, **9**, 4569 (2018).
- 9) W. Miao, K. Sakai, R. Imamura, K. Ito, H. Suga, T. Sakuma, T. Yamamoto, K. Matsumoto, "MET Activation by a Macrocyclic Peptide Agonist that Couples to Biological Responses Differently from HGF in a Context-Dependent Manner", *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, (2018).
- 10) W. Miao, K. Sakai, N. Ozawa, T. Nishiuchi, Y. Suzuki, K. Ito, T. Morioka, M. Umitsu, J. Takagi, H. Suga, *et al.*, "Cellular signaling and gene expression profiles evoked by a bivalent macrocyclic peptide that serves as an artificial MET receptor agonist", *Sci. Rep.*, **8**, 16492 (2018).
- 11) K. Nishio, R. Belle, T. Katoh, A. Kawamura, T. Sengoku, K. Hanada, N. Ohsawa, M. Shirouzu, S. Yokoyama, H. Suga, "Thioether Macrocyclic Peptides Selected against TET1 Compact Catalytic Domain Inhibit TET1 Catalytic Activity", *Chembiochem*, **19**, 979 (2018).
- 12) T. Passioura, B. Bhushan, A. Tumber, A. Kawamura, H. Suga, "Structure-activity studies of a macrocyclic peptide inhibitor of histone lysine demethylase 4A", *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 1225 (2018).
- 13) T. Passioura, W. Liu, D. Dunkelmann, T. Higuchi, H. Suga, "Display Selection of Exotic Macrocyclic Peptides Expressed under a Radically Reprogrammed 23 Amino Acid Genetic Code", *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 11551 (2018).
- 14) T. Passioura, K. Watashi, K. Fukano, S. Shimura, W. Saso, R. Morishita, Y. Ogasawara, Y. Tanaka, M. Mizokami, C. Sureau, *et al.*, "De Novo Macrocyclic Peptide Inhibitors of Hepatitis B Virus Cellular Entry", *Cell Chem. Biol.*, **25**, 906 (2018).
- 15) J.M. Rogers, S. Kwon, S.J. Dawson, P.K. Mandal, H. Suga, I. Huc, "Ribosomal synthesis and folding of peptide-helical aromatic foldamer hybrids", *Nat. Chem.*, **10**, 405 (2018).
- 16) J.M. Rogers, T. Passioura, H. Suga, "Nonproteinogenic deep mutational scanning of linear and cyclic peptides", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10959 (2018).

2. 総説・解説

- 1) Y. Goto, H. Suga, "Artificial In Vitro Biosynthesis Systems for the Development of Pseudo-Natural Products", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **91**, 410 (2018).
- 2) Y. Goto, H. Suga, "Engineering of RiPP pathways for the production of artificial peptides bearing various non-proteinogenic structures", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **46**, 82 (2018).
- 3) H. Hirose, C. Tsiamantas, T. Katoh, H. Suga, "In vitro expression of genetically encoded non-standard peptides consisting of exotic amino acid building blocks", *Curr Opin Biotechnol*, **58**, 28 (2019).
- 4) Y. Huang, M.M. Wiedmann, H. Suga, "RNA Display Methods for the Discovery of Bioactive Macrocycles", *Chem Rev*, **119**, 10360 (2019).
- 5) M.E. Otero-Ramirez, T. Passioura, H. Suga, "Structural Features and Binding Modes of Thioether-Cyclized Peptide Ligands", *Biomedicines*, **6**, (2018).

- 6) H. Suga, "Max-Bergmann award lecture: A RaPID way to discover bioactive nonstandard peptides assisted by the flexizyme and FIT systems", *J Pept Sci*, **24**, (2018).
- 7) K. Tajima, T. Katoh, H. Suga, "Genetic code expansion via integration of redundant amino acid assignment by finely tuning tRNA pools", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **46**, 212 (2018).
- 8) 後藤佑樹「人工生合成系を活用した擬天然物創製戦略」*Yakugaku Zasshi*, 138, 55-61 (2018).
- 9) 後藤佑樹「試験管内人工生合成系による擬天然物ペプチドの創製」*バイオサイエンスとインダストリー*, 76, 262-3 (2018).
- 10) 後藤佑樹「擬天然ペプチドによる中分子戦略」*PHARMSTAGE*, 17, 21-7 (2018).
- 11) 小松大和・後藤佑樹・菅裕明「擬天然ペプチドの試験管内人工生合成系による合成技術及びその医薬品候補分子探索への応用」*酵素工学ニュース*, 80, 23-8 (2018).
- 12) 宮入匡平・後藤佑樹・菅裕明「試験管内人工生合成系による擬天然ペプチド合成技術の開発及びその医薬品候補探索への応用」*BIO INDUSTRY*, 35, 31-9 (2018).

3. 著書

- 1) 木村寛之・加藤敬行・菅裕明「遺伝暗号リプログラミングを用いた特殊ペプチド翻訳合成と高速探索技術」中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術, シーエムシー出版 89-98 (2018).
- 2) 後藤佑樹「天然物ペプチドの生合成機構を活用した人工ペプチドの生産」*CSJ カレントレビュー*30, 生命機能に迫る分子化学, 化学同人, 151-6 (2018).

4. その他

- 1) 菅 裕明, Toby Passioura, 渡士 幸一, 脇田 隆字「NTCP 阻害剤」特願 2018-002814
- 2) 菅 裕明, 後藤 佑樹, 阿部 郁朗, 岡田 正弘, 井上 澄香「ペプチドライブラリーの製造方法」特願 2018-196102
- 3) 菅 裕明, Toby Passioura, 伊藤 健一郎, 松本 邦夫, 酒井 克也, 佐藤 拓輝「環状ペプチド」特願 2018-167102
- 4) 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「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」特願 2018-185481
- 5) 菅 裕明, 高木 淳一「新たな結合特異性を抗体に付与する超汎用法」特願 2018-144345
- 6) フロントランナー挑む「創薬の異端「ペプチド」を先端にする：菅 裕明」*日経サイエンス*, 2018 年 3 月号.
- 7) 若手研究者の肖像「東京大学大学院理学系研究科 後藤佑樹 准教授」*日経バイオテク*, 2018. 2. 12.