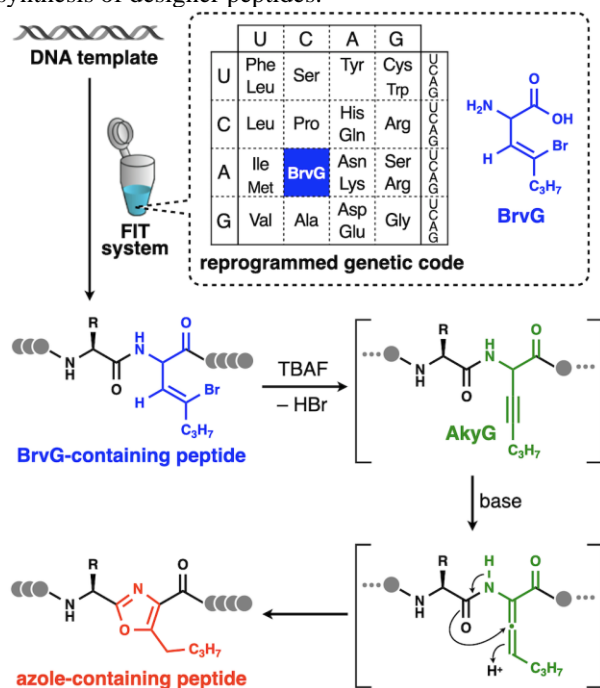


## Annual Research Highlights

### (1) “Posttranslational chemical installation of azoles into translated peptides”

Azoles, five-membered heterocycles found in the backbones of many peptidic natural products, can enhance the structural rigidity and lipophilicity of peptides and contribute to potent binding to the targets as well as improved membrane permeability. Despite the fact that recent advances in engineering of *in vitro* translation systems have allowed for ribosomal incorporation of diverse and exotic building blocks, direct incorporation of an azole ring(s) into the peptide backbone by translation remains a major challenge.

In the present study, we have reported a method of ribosomal synthesis of azole-containing peptides involving specific ribosomal incorporation of a bromovinylglycine derivative (BrvG) into the nascent peptide chain and its chemoselective conversion to a unique azole structure (Fig. 1). In this method, ribosomally expressed peptides containing BrvG are subjected to tetrabutylammonium fluoride (TBAF)-induced dehydrobromination conditions, where the BrvG residue can be specifically converted to the corresponding backbone oxazole moiety. This method enables us to install exotic azole groups, oxazole and thiazole, at designated positions in the peptide chain with both linear and macrocyclic scaffolds and thereby expand the repertoire of building blocks in the mRNA-templated synthesis of designer peptides.



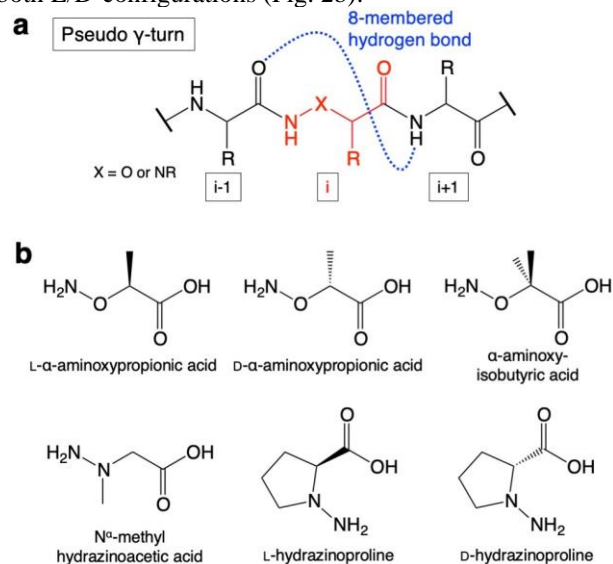
**Fig. 1** Schematic illustration of the chemical posttranslational modification for *in vitro* ribosomal synthesis of azole-containing peptides.

1.(1)-16) *Nat. Commun.*, **12**, 696 (2021)

### (2) “Consecutive ribosomal incorporation of $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids into nascent peptide chains”

$\alpha$ -Aminoxy acid and  $\alpha$ -hydrazino acid are  $\beta$ -amino-acid analogs, where the  $\beta$ -carbon is substituted with oxygen and nitrogen, respectively. These molecules induce pseudo  $\gamma$ -turn of peptides via formation of an 8-membered-ring hydrogen bond between the adjacent amino acids (Fig. 2a). In addition,  $\alpha$ -aminoxy acid induces lone pair repulsion between heteroatoms to reinforce hydrogen bonding.  $\alpha$ -Hydrazino acid forms a bifurcated hydrogen bond via a lone electron pair at the  $\alpha$ -nitrogen. Therefore,  $\alpha$ -aminoxy and  $\alpha$ -hydrazino acids are able to fold peptides into unique structures such as hairpins and helices, and are attractive building blocks of bioactive foldamer peptides.

Since  $\beta$ -amino acids are poor substrates for ribosomal incorporation, consecutive incorporation of  $\beta$ -amino acids is extremely difficult. Similarly, consecutive/multiple incorporation of  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acid is challenging and has never been demonstrated to date. However, we have recently developed an engineered tRNA, referred to as tRNA<sup>Pro1E2</sup>, whose T-stem and D-arm were designed so as to efficiently recruit translation factors, EF-Tu and EF-P, respectively. Use of tRNA<sup>Pro1E2</sup> resulted in a remarkable enhancement of consecutive incorporation of  $\beta$ -amino acids. Since  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids are  $\beta$ -amino-acid analogs, here we expected that their ribosomal incorporation can also be enhanced by using tRNA<sup>Pro1E2</sup>. Consequently, we demonstrated for the first time ribosomal synthesis of various model peptides, including macrocyclic peptide scaffolds, bearing multiple/consecutive  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids with both L/D-configurations (Fig. 2b).



**Fig. 2** Ribosomal incorporation of  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids into peptides. (a) Pseudo  $\gamma$ -turn of peptides induced by  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids. (b) Examples of  $\alpha$ -aminoxy/ $\alpha$ -hydrazino acids that are introduced into model peptides.

1.(1)-6) *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 18844 (2021)

研究ハイライト

(1) 翻訳後化学的修飾によるアゾール含有ペプチドの翻訳合成

多くのペプチド性天然物の骨格に見られる 5 員環の複素環であるアゾール環構造は、ペプチドの立体配座の安定性や親油性を高め、標的への強力な結合や膜透過性の向上に寄与している。近年の翻訳合成系の改変技術の進歩により、多様な非タンパク質性残基を含んだペプチドをリボソームで生産できるようになってきたが、アゾール環を翻訳によってペプチド骨格に直接組み込むことは依然として困難であった。

本研究では、ブロモビニルグリシン誘導体 (BrvG) を改変翻訳系でペプチド鎖に特異的に組み込んだ後に選択的な化学修飾を行うことで、アゾール含有ペプチドを翻訳合成する方法論を確立した (図 1)。本手法では、リボソームで合成した BrvG を含有ペプチドをテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) で処理することでデヒドロブロモ化を引き起こすことで、BrvG 残基を対応する主鎖オキサゾール骨格へと特異的に変換する。類似の方法により、オキサゾールだけでなく含硫黄チアゾール環の合成にも成功した。これにより、主鎖アゾール環を、直鎖および大環状化ペプチド鎖の指定位置に導入することで、人工設計した配列のアゾールペプチドを mRNA 鋳型依存的な生産を実現した。

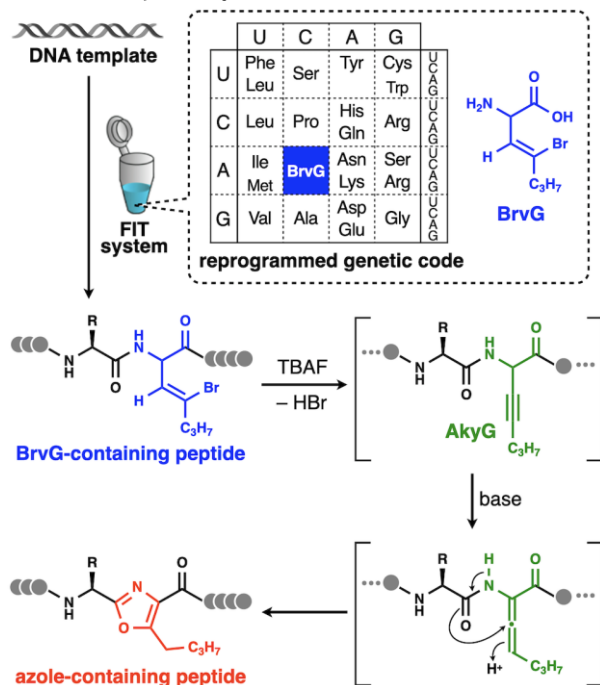


図 1 アゾール含有ペプチドの in vitro リボソーム合成のための化学的翻訳後修飾の模式図。

1.(1)-16) *Nat. Commun.*, **12**, 696 (2021)

(2) リボソーム翻訳による  $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸のペプチド鎖への連続導入

$\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸は  $\beta$ -アミノ酸のアナログであり、 $\beta$ -炭素が酸素原子及び窒素原子に置換された構造を持つ。これらの化合物をペプチド鎖中に導入すると分子内で 8 員環水素結合を形成し、シュード  $\gamma$ -ターン構造を誘起する (図 2a)。さらに、 $\alpha$ -アミノキシ酸では孤立電子対の反発によりこの水素結合が安定化され、 $\alpha$ -ヒドラジノ酸では  $\alpha$ -窒素が分岐水素結合形成に関与することで構造が安定化される。以上のことから、これらの分子はペプチドを強固に折り畳む効果を示すため、新規生理活性フォルダマーペプチドの開発基盤として魅力的である。

一方で、リボソーム翻訳による  $\beta$ -アミノ酸の導入効率は低く、ペプチド鎖中に連続導入することは従来非常に困難であった。 $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸についても同様であると考えられ、複数ないし連続で翻訳導入された例はない。しかし、近年我々は T-ステムと D-アームの構造を最適化した tRNA<sup>ProIE2</sup> という人工 tRNA の開発に成功した。この tRNA は 2 種の翻訳因子 EF-Tu および EF-P に対する親和性を高めることにより、 $\beta$ -アミノ酸の導入効率を飛躍的に向上させた。本研究では、tRNA<sup>ProIE2</sup> を  $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸の翻訳に適用することにより、様々なモデルペプチドへの連続導入に初めて成功した (図 2b)。

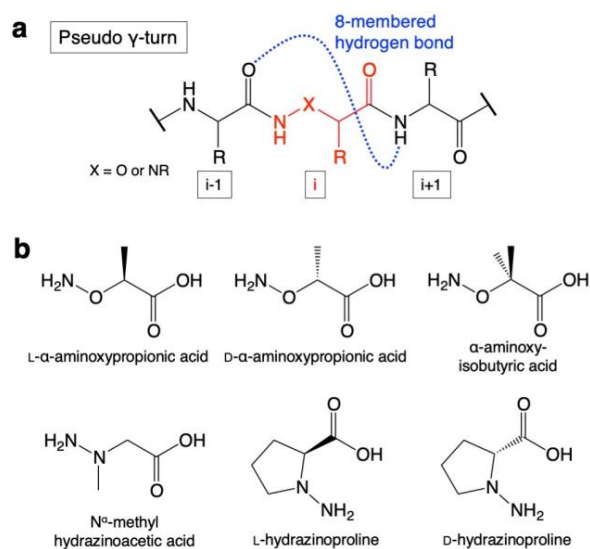


図 2  $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸の翻訳導入。(a)  $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸が誘起するシュード  $\gamma$ -ターン構造。(b) 翻訳導入された  $\alpha$ -アミノキシ酸および  $\alpha$ -ヒドラジノ酸の例。

1.(1)-6) *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 18844 (2021)

## 1. 原著論文

### (1) Refereed Journals

- 1) K.E. Chen, Q. Guo, T.A. Hill, Y. Cui, A.K. Kendall, Z. Yang, R.J. Hall, M.D. Healy, J. Sacharz, S.J. Norwood, *et al.*, "De novo macrocyclic peptides for inhibiting, stabilizing, and probing the function of the retromer endosomal trafficking complex", *Sci Adv*, **7**, eabg4007 (2021).
- 2) D.J. Ford, N.M. Duggan, S.E. Fry, J. Ripoll-Rozada, S.M. Agten, W. Liu, L. Corcilus, T.M. Hackeng, R. van Oerle, H.M.H. Spronk, *et al.*, "Potent Cyclic Peptide Inhibitors of FXIIa Discovered by mRNA Display with Genetic Code Reprogramming", *J Med Chem*, **64**, 7853 (2021).
- 3) V.A. Haberman, S.R. Fleming, T.M. Leisner, A.C. Puhl, E. Feng, L. Xie, X. Chen, Y. Goto, H. Suga, L.V. Parise, *et al.*, "Discovery and Development of Cyclic Peptide Inhibitors of CIB1", *ACS Med Chem Lett*, **12**, 1832 (2021).
- 4) S. Imanishi, T. Katoh, Y. Yin, M. Yamada, M. Kawai, H. Suga, "In Vitro Selection of Macrocyclic D/L-Hybrid Peptides against Human EGFR", *J Am Chem Soc*, **143**, 5680 (2021).
- 5) Y. Iwane, H. Kimura, T. Katoh, H. Suga, "Uniform affinity-tuning of N-methyl-aminoacyl-tRNAs to EF-Tu enhances their multiple incorporation", *Nucleic Acids Res*, **49**, 10807 (2021).
- 6) T. Katoh, H. Suga, "Consecutive Ribosomal Incorporation of  $\alpha$ -Aminoxy/ $\alpha$ -Hydrazino Acids with L/D-Configurations into Nascent Peptide Chains", *J Am Chem Soc*, **143**, 18844 (2021).
- 7) H. Kimura, H. Suga, "Incorporation of backbone modifications in mRNA-displayable peptides", *Methods Enzymol*, **656**, 521 (2021).
- 8) Y. Komatsu, N. Terasaka, K. Sakai, E. Mihara, R. Wakabayashi, K. Matsumoto, D. Hilvert, J. Takagi, H. Suga, "De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist", *iScience*, **24**, 103302 (2021).
- 9) W. Liu, S.J. de Veer, Y.H. Huang, T. Sengoku, C. Okada, K. Ogata, C.N. Zdenek, B.G. Fry, J.E. Swedberg, T. Passioura, *et al.*, "An Ultrapotent and Selective Cyclic Peptide Inhibitor of Human beta-Factor XIIIa in a Cyclotide Scaffold", *J Am Chem Soc*, **143**, 18481 (2021).
- 10) E. Mihara, S. Watanabe, N.K. Bashiruddin, N. Nakamura, K. Matoba, Y. Sano, R. Maini, Y. Yin, K. Sakai, T. Arimori, *et al.*, "Lasso-grafting of macrocyclic peptide pharmacophores yields multi-functional proteins", *Nat Commun*, **12**, 1543 (2021).
- 11) M. Nagano, Y. Huang, R. Obexer, H. Suga, "One-Pot In Vitro Ribosomal Synthesis of Macrocyclic Depsipeptides", *J Am Chem Soc*, **143**, 4741 (2021).
- 12) L. Puppulin, D. Kanayama, N. Terasaka, K. Sakai, N. Kodera, K. Umeda, A. Sumino, A. Marchesi, W. Weilin, H. Tanaka, *et al.*, "Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy", *ACS Appl Mater Interfaces*, **13**, 54817 (2021).
- 13) J.M. Rogers, M. Nawatha, B. Lemma, G.B. Vamisetti, I. Livneh, U. Barash, I. Vlodavsky, A. Ciechanover, D. Fushman, H. Suga, *et al.*, "In vivo modulation of ubiquitin chains by N-methylated non-proteinogenic cyclic peptides", *RSC Chem Biol*, **2**, 513 (2021).
- 14) M. Saito, Y. Itoh, F. Yasui, T. Munakata, D. Yamane, M. Ozawa, R. Ito, T. Katoh, H. Ishigaki, M. Nakayama, *et al.*, "Macrocyclic peptides exhibit antiviral effects against influenza virus HA and prevent pneumonia in animal models", *Nat Commun*, **12**, 2654 (2021).
- 15) E. Stefan, R. Obexer, S. Hofmann, K. Vu Huu, Y. Huang, N. Morgner, H. Suga, R. Tampe, "De novo macrocyclic peptides dissect energy coupling of a heterodimeric ABC transporter by multimode allosteric inhibition", *Elife*, **10**, (2021).
- 16) H. Tsutsumi, T. Kuroda, H. Kimura, Y. Goto, H. Suga, "Posttranslational chemical installation of azoles into translated peptides", *Nat Commun*, **12**, 696 (2021).
- 17) A.A. Vinogradov, M. Nagano, Y. Goto, H. Suga, "Site-Specific Nonenzymatic Peptide S/O-Glutamylation Reveals the Extent of Substrate Promiscuity in Glutamate Elimination Domains", *J Am Chem Soc*, **143**, 13358 (2021).

- 18) M. Wiedmann, P.K. Dranchak, M. Aitha, B. Queme, C.D. Collmus, M.M. Kashipathy, L. Kanter, L. Lamy, J.M. Rogers, D. Tao, *et al.*, "Structure-activity relationship of ipglyceramide binding to phosphoglycerate mutases", *J Biol Chem*, **296**, 100628 (2021).

## 2. 総説・解説

- 1) Y. Goto, H. Suga, "The RaPID Platform for the Discovery of Pseudo-Natural Macrocyclic Peptides", *Acc Chem Res*, **54**, 3604 (2021).
- 2) M. Montalban-Lopez, T.A. Scott, S. Ramesh, I.R. Rahman, A.J. van Heel, J.H. Viel, V. Bandarian, E. Dittmann, O. Genilloud, Y. Goto, *et al.*, "New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering", *Nat Prod Rep*, **38**, 130 (2021).
- 3) H. Peacock, H. Suga, "Discovery of De Novo Macrocyclic Peptides by Messenger RNA Display", *Trends Pharmacol Sci*, **42**, 385 (2021).
- 4) H. Suga, "The first year of RSC Chemical Biology - a new journal was born", *RSC Chem Biol*, **2**, 10 (2021).
- 5) S. Taguchi, H. Suga, "Targeting of extracellular protein-protein interactions with macrocyclic peptides", *Curr Opin Chem Biol*, **62**, 82 (2021).
- 6) 三浦 敬, 加藤 敬行, 菅 裕明「D- $\alpha$ -アミノ酸や $\beta$ -アミノ酸を含む次世代特殊環状ペプチド探索技術の開発とその応用」*生化学 Journal of Japanese Biochemical Society*, **93**, 349 (2021).
- 7) 田口 翔大, 西村 仁孝, 後藤 佑樹, 加藤 敬行, 菅 裕明「創薬シーズとしての環状ペプチドの優位性」*生物工学会誌*, **99**, 4, 16 (2021).

## 3. 著書

- 1) T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, " In Vitro Selection of Thioether-Closed Macrocyclic Peptide Ligands by Means of the RaPID System", *Peptide Macrocycles*, pp247-259, Springer
- 2) Y. Goto, M. Nagano, H. Suga, "Mid-Sized Macrocyclic Peptides as a New Drug Modality", *Middle Molecular Strategy*, pp97-107, Springer
- 3) T. Katoh, Y. Goto, T. Passioura, H. Suga, "Development of flexizyme aminoacylation ribozymes and their applications" *Ribozymes: Principles, Methods, Applications*, Wiley-VCH
- 4) 池之上 達哉, 河上 直也, 菅 裕明「ペプチドおよびタンパク質と疾患の化学」*生体分子と疾患-ヘルスサイエンスの切り札としての化学-*, 第2章, pp18-22 (2021).
- 5) 川合 茉莉奈, 井上 澄香, 寺坂 尚紘, 菅 裕明「特殊環状ペプチドライブラリの構築と薬剤候補探索」*生体分子と疾患-ヘルスサイエンスの切り札としての化学-*, 第17章, pp150-155 (2021).

## 4. その他

- 1) 国際出願 PCT/JP2021/026039, 「環状ペプチド、ペプチド複合体、並びに、当該環状ペプチド及び／又は当該ペプチド複合体を含む医薬組成物」, 菅裕明, Runit Maini (国立大学法人東京大学)
- 2) 特許出願 2021903307, 「Methods of display for disulfide-knotted peptides and the use of thereof」, 菅裕明, Wenyu Liu, Toby Passioura (国立大学法人東京大学, The University of Queensland)
- 3) 特許出願 2021170768, 「化合物の製造方法、化合物ライブラリーの製造方法、化合物ライブラリー及びスクリーニング方法」, 菅裕明, 後藤佑樹, Yuchen Zhang, 岡田正弘 (国立大学法人東京大学)