

令和 3 年 10 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26220204

研究課題名（和文）環状最小ペプチド酵素の創製

研究課題名（英文）Generation of minimal peptide catalysts based on the macrocyclic scaffold

研究代表者

菅 裕明 (Suga, Hiroaki)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：00361668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 141,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究目的は、短鎖ペプチドを大環状化することで構造的に束縛（constrained）した空間をもつペプチドライブラリーを翻訳合成し、様々な触媒機能をもつペプチド分子を探索することに挑戦するものである。本研究の結果、アシルトランスフェラーゼ活性を有する活性種の探索に成功した。発見した大環状ペプチドは、特定アミノ酸残基の側鎖水酸基を選択的にエステル化した。さらにエステル化配列を天然物にみられる環状デブシペプチドのワンポッド合成法へと展開した。今回の成果は、大環状ペプチド骨格が短鎖ペプチド触媒探索に有用であることを示すばかりでなく、「酵素の起源」に迫るための技術となり得ることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質酵素は、生体内の大半の触媒反応を担う生体分子である。しかしながら、現在までの生命科学分野の発展をもってしても、どのように複雑な酵素が進化してきたか、その過程は未だ多くの謎に包まれている。それに対し、本研究の結果、分子量300ほどの極小のペプチドが生体内に存在するアシル化活性を有することを発見できた。本知見は、「酵素の起源」に一石を投じるものであるといえる。またエステル結合を官能基選択的に創り出すアシル化反応は生化学分野のみならず、有機化学分野を含めた幅広い分野で非常に稀であるため学術的価値が高い。

研究成果の概要（英文）： Protein enzymes catalyze many pivotal chemical reactions in the body. Despite the great advances of the field of life science so far, however, how the evolution of enzymes was proceeded is still unknown. We hypothesized that the short peptides would have been main biocatalysts in the evolutionary process to the “protein world”. The purpose of this research is to generate minimal peptide catalysts based on the macrocyclic scaffold. To address this, we generated the trillions of constrained macrocyclic peptides and selected out the peptides in which have the acyltransferase activity by means of a combination of the FIT system and the mRNA display technique. After the selection rounds, we discovered the acyltransferase active macrocyclic peptides and the further thorough investigation revealed that the linear short peptide has a self-acylation activity. We believe that this finding accelerates the development of a research for the “peptide world” before the “protein world”.

研究分野：生物分子化学

キーワード：ペプチド 天然物 翻訳 リボザイム ケミカルバイオロジー 酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質酵素は、生体内の大半の触媒反応を担う生体分子である。その触媒部位は、いずれの酵素をみても、触媒残基や標的分子への結合を担う残基が立体的に巧妙に配置されており、どのように複雑な酵素が進化してきたか、その過程は未だ多くの謎に包まれている。既知の酵素の中で最も短鎖といわれる 4-oxalocrotonate tautomerase ですら 62 残基の長さをもち、20 種類のアミノ酸からその組み合わせが生まれる確率の単純計算は、 $10^{80}$  分の 1 という、まさに気の遠くなりそうな稀さになる。一方、タンパク質が生まれる前に触媒機能を担ったとされる RNA 触媒 (リボザイム) は、RNA ワールドでその機能を進化させ、ついにはタンパク質合成装置、いわゆる「原始翻訳系」を作り上げられたと考えられる。しかし、RNA 分子だけで構成された原始翻訳系では、現在の翻訳系のように効率よく長鎖ペプチド (タンパク質) を合成できなかったと考えられ、せいぜい 20 残基程度の短鎖ペプチドの合成が可能だったと考えるのが妥当であろう。

これまでも多くの優れたタンパク質化 (科) 学者、ペプチド化 (科) 学者がこの謎に迫ろうと実験を試みてきた。それらの多くの試みは、既知の 2 次構造モジュール (  $\alpha$ -ヘリックスや  $\beta$ -シート ) を *in silico* あるいは *in vitro* で実験的に組み合わせることで、酵素機能を獲得するようデザインした、いわゆる *de novo* タンパク質であった。そして、ある程度の成功 (低活性触媒機能の観測) をおさめてきたのも事実だ。しかし、その長さは 50 残基を下回ることはなく、原始翻訳系の伸長機能を考慮すると、未だ上述の進化の謎に迫れたとはいえない。

本研究計画は、短鎖ペプチドを大環状化することで、構造的に束縛 (constrained) した空間をもつペプチドライブラリーを翻訳合成し、様々な触媒機能を持つペプチド分子を探索することに挑む。究極的には大環状ペプチドの人工進化系を用いた「酵素起源」に迫るともいえる基礎研究提案でもある。

### 2. 研究の目的

本研究目的は、短鎖ペプチドを大環状化することで構造的に束縛 (constrained) した空間をもつペプチドライブラリーを翻訳合成し、様々な触媒機能をもつペプチド分子を探索することに挑戦するものである。究極的には、大環状ペプチドの人工セレクション系を用いた「酵素起源」の探索とも言える基礎研究提案でもある。具体的には、

- ① 3次元空間を生み出す大環状ペプチド (1環~3環) ライブラリーの構築
- ② 触媒活性種のセレクション
- ③ 大環状ペプチド触媒の反応機構および構造の解明

を達成目標に掲げた。

### 3. 研究の方法

研究の目的で掲げた①~③を達成すべく、これまで当研究室で培ってきたリボザイムのセレクション、RaPID システムを用いたセレクション技術の全ノウハウを注ぎ込み、4つの異なる活性をもつ大環状ペプチド探索を推進する。①では、N末端に配置した ClAc 基の特性を生かし、選択的な 1環、2環、3環の大環状ペプチドライブラリーの合成戦略を確立する。②では、(2a)レドックス触媒、(2b)キナーゼ、(2c)アシルトランスフェラーゼ、(4d)糖転移触媒、を具体的な活性種探索の候補に掲げ本研究を遂行した。そこで、まずは自己修飾型 (*cis*-acting) 触媒活性種の探索を並行して行い、できる限り全目標の達成に挑む。③では、自己修飾型触媒ペプチドの機能と構造の解明を進め、その分子機構を理解すると同時に、*cis* から *trans*-acting、すなわちターンオーバー型触媒へのエンジニアリングを展開する。

### 4. 研究成果

年度に完全に目標を達成した (業績論文 13)。我々はこれまで N末端に配置したクロロアセチル基と下流のシステインのアルキル化により 1環状のペプチドライブラリーの構築を行ってきた。このとき、クロロアセチル基は N末端より 3残基目以降の下流の最も近傍に存在するシステインと自発的にアルキル化が起こり 1環状化が完了する。一方で、我々は開始アミノ酸に隣接する 2残基目のシステインは環化不可であることに着目した (OBC, 2012, 5783)。そこでペプチド

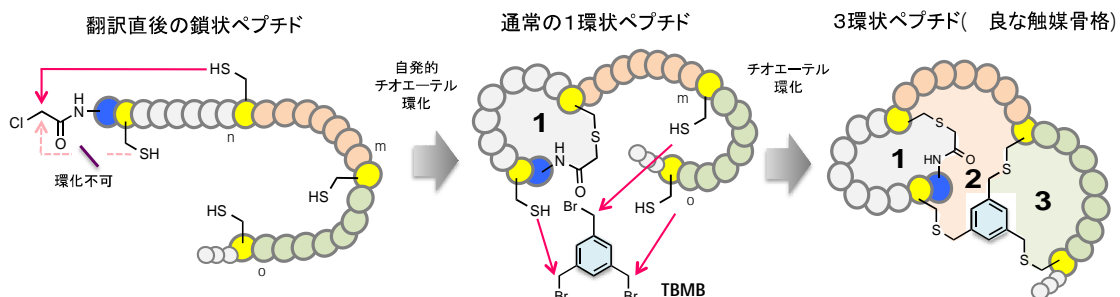


図1 *in vitro* 翻訳系により合成したペプチドに対する位置選択的な翻訳後修飾により、3環状ペプチドの合成法を開発した

ドの1環状化後、ペプチド上で位置選択的なビスアルキル化を施すことで、3環状のペプチドへ導く手法の開発に着手した。まず、4つのシステインをもつ鎖状ペプチドを翻訳合成し、位置選択的な1環化反応を起こさせる。それから未反応の3つシステイン残基をトリプロモメチルベンゼン(TBMB)を使ってトリアルキル化を行ったところ、3環状ペプチドが定量的に合成できた(図1)。さらに詳細な検討を行なった結果、この3環化法は様々なアミノ酸配列、配列長に適用できる有用な手法であることがわかった。本研究では短鎖の1環状ペプチドを触媒として用いるが、効率の良い触媒機能を獲得するために、より複雑な三次元構造を有する3環状ペプチドライブラリーを触媒分子として応用することも可能となった。

②触媒活性種のセレクション 本研究では、生命活動(あるいは生命起源)に関与する重要な3反応を自己触媒する分子を探索し、発見に挑んだ。具体的には、レドックス触媒、キナーゼ触媒、アシルトランスフェラーゼ、糖転移触媒である。以下に順次記述する。

**レドックス反応** レドックス(酸化還元)反応とはアルコール酸化や不飽和炭素の還元等、生命活動に不可欠な物質を合成する反応であり、この反応を触媒する酵素は、 $NAD^+/NADH$ 等に代表される補酵素を酸化/還元剤として用いている。本実験では、基質であるベンジルアルコールの $NAD^+$ 依存的な酸化を触媒する環状ペプチドを探索した(図2)。ベンジルアルコールを側鎖に修飾したN-クロロアセチル化開始アミノ酸を翻訳系に導入することで、ベンジルアルコールを含有する環状ペプチドライブラリーを発生させた。次いで $NAD^+$ の存在下、ベンズアルデヒドへの酸化を行い、酸化されたペプチドをヒドラジド-ビオチンでヒドラゾン化を介して活性種選択的にビオチン標識を行なった。常法に則りアシル化反応後のビオチン化された活性種をストレプトアビジン磁気ビーズに吸着することにより活性種配列を単離、逆転写、PCRを経て配列を増幅した。このプロセスを5~7回繰り返すことで、高活性種の濃縮を試み、最終的に濃縮された配列をmRNA(逆転写でcDNA)から読み取る。

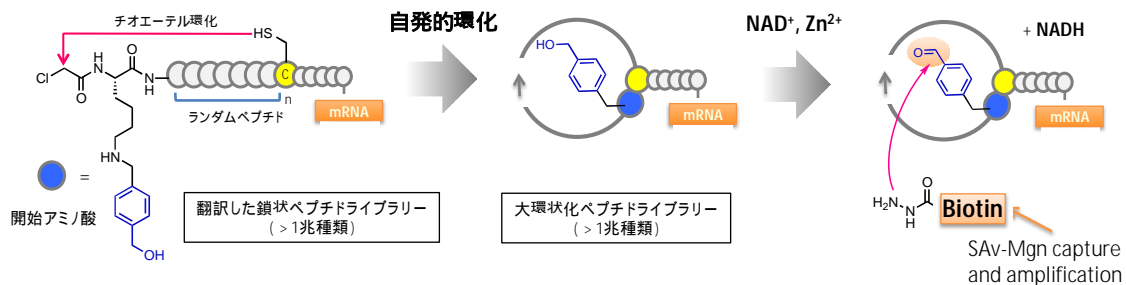


図2 環状ペプチドライブラリーからの自己レドックス触媒活性を有する最小酵素の探索戦略

まずは予備検討を行い、酸化体であるベンズアルデヒドを含有したペプチドライブラリーを選択的に回収できる系を確立した。続いてベンジルアルコールを基質として実際に酸化触媒の探索を行ったところ、活性種の濃縮と思われる結果が定量PCRにより確認されたため、配列解析・およびクローンペプチドを用いたMSによる酸化反応の解析を行なった。詳細な解析の結果、酸化反応は期待した $NAD^+$ と環状ペプチドの部分だけでなく、ペプチドにリンクしているDNAあるいはmRNAテンプレート依存的にベンジルアルコールの酸化を触媒していることが示唆された。これは核酸-ペプチドのハイブリッド触媒機能であることから(実際に翻訳に用いるリボソームは核酸-ペプチドのハイブリッド触媒)「酵素起源」に近づく重要な発見であるとは考えられるが、特定の核酸配列が必須なのかなど、触媒に重要な配列の解析には至っていない。今後さらなる解析を進める予定である。

**キナーゼ** タンパク質あるいはペプチドのリン酸化は、生命活動の様々な局面で重要な役割を果たしている。キナーゼはリン酸化を触媒する酵素であり、一般的にはATPをリン酸ドナーとして用い、標的ペプチドをリン酸化する。そこで本計画では、1環および複環ペプチドのC末端側にリン酸化の基質となる基質ペプチドを配置し、ATP- $\gamma$ Sをリン酸ドナーとして用いることで、キナーゼ機能を持つ活性種を単離する。ペプチド基質としては、ヒストンH3のN末端配列を最初のモデルとして選択し、環状ライブラリー配列部位のC末端下流に翻訳合成に

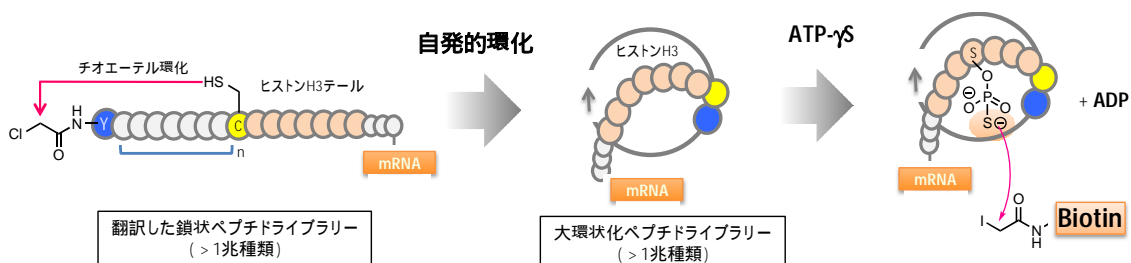


図3 環状ペプチドライブラリーからの自己キナーゼ触媒活性を有する最小酵素の探索戦略

より導入した(図2B)。ATPの代わりにATP-Sを用いることで、触媒機能を持つ活性種の働きで、ヒストンH3部位7~19位(ARKSTGGKAPRKQ)のセリン・スレオニンが自己チオリン酸化されるのを狙った。この分子内反応で起きたチオリン酸部位に選択的にヨードピオチン誘導体を用いてピオチン化することで、活性種をストレプトアビジン磁気ビーズに吸着し濃縮を行なった。

まず1環状ペプチドライブラリーを用いて探索を行なったが、活性種の濃縮には至らなかった。そこで、ルイス酸の検討(MgあるいはMg/Mn混合物)、リン酸化ペプチドの補足法(抗リン酸化抗体を用いた手法)あるいは2環ペプチドライブラリーを触媒骨格として用いるなど、活性種獲得のため精力的に取り組んだが、活性種を得ることができなかった(結果的に、抗体のCDRに選択的に結合するペプチドなどユニークな種は獲得しているが、本件とは関係ないため継続していない)。

**糖転移触媒** 本研究では、糖基質をペプチド鎖に導入する技術開発が極めて重要であり、その過程で新たな方法論を確立する必要があった。その結果、リンカーを介さず、システイン側鎖に直接S-グリコシル基を翻訳系内で導入する技術を開発でき、成果を研究誌に発表した(論文業績5)。糖転移酵素の探索は、探索に成功した他の活性種の機能解明実験を優先したため行っていない。

**アシルトランスフェラーゼ** タンパク質あるいはペプチドのアシル化(アセチル化も含む)も、リン酸化と同様に生命活動における不可欠な生体内分子修飾である。アシルトランスフェラーゼは、一般的にアシルCoAを補酵素として使い、アシル基を標的のアミノ酸側鎖にトランスファー(転移)し、標的に新しくアミド、あるいはエステル結合を作る。共基質としてピオチン-ベンジルチオエステル体を化学合成することでアシルドナーとして用い、自己アシル化する活性種を探索することにした。ペプチド基質としては、キナーゼ探索(図3)と同様にヒストンH3を選ぶことで、調製済みのライブラリーを流用した。アシルトランスフェラーゼ活性を有する活性種は、ヒストンH3部位7-19位(ARKSTGGKAPRKQ)にある任意のリジン残基、あるいはセリン/スレオニン残基にトランスファーすることで自己修飾(*cis-acting*)し、ヒストンペプチドをピオチン化することを期待した。

1環の大環状ペプチドライブラリーを用いて探索を行ったところ、高い回収率でアシル化体が得られるようになったため、7ラウンド後に回収したcDNAの配列を読むことで収束したペプチド配列を解析した。収束したペプチド配列をもつクローンを翻訳合成し、MALDI-TOF MSで触媒機能について評価したところ、いくつかのペプチドで、ピオチン化(+226)に相当する分子量の変化が確認できた。また環状ではなく、同配列を有する鎖状のペプチドでもアシル化反応が進行し、アシル化ペプチドのMS/MSを行うと、セリン残基がピオチン化を受けていることが示唆された。このように、我々は環状ペプチドライブラリーから、自己アシル転移活性を有するペプチドを見出すことに成功したことから、当初の研究計画通りにワークしたといえる。

③ **大環状ペプチド触媒の反応機構および構造の解明** 活性種の探索に成功した自己アシル転移ペプチドに関して詳細な反応機構の解明を行なったところ、酵素に比類する高い官能基・位置選択性でセリンへのエステル化を触媒することが明らかとなった。

続いて、発見したアシル化モチーフのケミカルバイオロジー的な応用として、天然物にみられる環状デブシペプチドのワンポッド合成法へと展開した。環状デブシペプチドは非リボソーム系のタンパク質クラスターで構成されるため、生化学的な手法で変異体へのエンジニアリング、あるいはライブラリー化が困難であることが知られている。一方、化学合成は多彩な環状デブシペプチドを合成することが可能だが、ロースルーブットであるため合成に時間がかかり、ライブラリー化、あるいはスクリーニングへの応用性に乏しい。そこで我々は、本自己エステル化モチーフとチオエステル主鎖を有する鎖状ペプチドを基質として用いれば、翻訳系後自発的に環状デブシペプチドが生成できるのではないかと考えた。最小モチーフとペプチド主鎖にチオエステル(チオデブシペプチド)(業績2)を有するペプチドを翻訳系で発生させたところ、翻訳開始から30分で、望む環状デブシペプチドがほぼ定量的に合成できることをMALDI-TOD MSで確認した。

まとめ 短鎖ペプチドを大環状化することで構造的に束縛(constrained)した空間をもつペプチドライブラリーを翻訳合成し、触媒機能をもつペプチド分子を探索することに挑戦した結果、「自己アシルトランスフェラーゼ活性」を有する環状ペプチドの発見に成功した。またその最小モチーフを天然物様の環状デブシペプチドの迅速・簡便合成法への応用することに成功した。本モチーフは、有機化学合成、*in vitro*タンパク質合成など幅広い分野に適合できることを確認しており、今後はエステル結合を官能基選択的、且つ位置選択的に創り出す稀有な配列として別分野における新技術へと展開できると考える。本研究は、巨大なタンパク質が進化により獲得した触媒機能を、人工進化的に極小のペプチドで再現させる非常に挑戦的なものである。研究成果としてたった分子量300ほどの「極小のペプチド」が自己触媒活性を有するという発見に至った。この結果は、本研究で用いた戦略が「酵素起源」の謎に迫るうえで有効な手段の一つになることを示すのは自明である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件、抜粋) 全て査読有りのため、記載を省略する .

1. Macrocyclic Peptides as Drug Candidates: Recent Progress and Remaining Challenges.  
A.A. Vinogradov; Y. Yin; H. Suga\*  
**Journal of the American Chemical Society**, 141, 4167-4181 (2019). DOI: 10.1021/jacs.8b13178
2. Ribosomal Synthesis of Backbone-Cyclic Peptides Compatible with In Vitro Display  
R. Takatsuji; K. Shinbara; T. Katoh; Y. Goto; T. Passioura; R. Yajima; Y. Komatsu; H. Suga\*  
**Journal of the American Chemical Society**, 141, 2279-2287 (2019). DOI: 10.1021/jacs.8b05327
3. De Novo Discovery of Nonstandard Macrocyclic Peptides as Noncompetitive Inhibitors of the Zika Virus NS2B-NS3 Protease  
T.P.C. Nitsche, P. Varava, M.C. Mahawaththa, M.M. Leuthold, C.D. Klein, H. Suga\*, G. Otting  
**ACS Med. Chem. Lett.**, 10, 168-174 (2019). DOI: 10.1021/acsmchemlett.8b00535
4. Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation  
T. Katoh, K. Tajima, H. Suga\*,  
**Cell Chemical Biology**, 24, 46-54 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.11.012>
5. Linker-free incorporation of carbohydrates into *in vitro* displayed macrocyclic peptides  
S. A. K. Jongkees, S. Umemoto, H. Suga\*,  
**Chemical Science**, 8, 1474-1481 (2017). DOI: 10.1039/c6sc04381j
6. Essential structural elements in tRNA<sup>Pro</sup> for EF-P-mediated alleviation of translation stalling  
T. Katoh, I. Wohlgemuth, M. Nagano, M. V. Rodnina, H. Suga\*  
**Nature Communications**, May 24;7, 11657 (2016). doi: 10.1038/ncomms11657.
7. Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes  
Y. Iwane; A. Hitomi; H. Murakami; T. Katoh; Y. Goto; H. Suga\*  
**Nature Chemistry**, 8, 317-325 (2016). <https://doi.org/10.1038/nchem.2446>
8. Synthesis of fused tricyclic peptides using a reprogrammed translation system and chemical modification  
N.K. Bashiruddin; M. Nagano; H. Suga\*  
**Bioorganic chemistry**, 61, 45-50 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.06.002>

[学会発表] (招待講演のみ) (計 62 件、抜粋して記載)

1. 11th AACR-JCA Joint Conference, Plenary Speaker, Maui, USA, 2/11, 2019
2. World Biosimilar Congress US, San Diego, USA, 3/4, 2019
3. Organic Chemistry Seminar, Colorado State University, Fort Collins, 4/5, 2019
4. Drug Discovery Chemistry Summit, San Diego, USA, 4/9, 2019
5. Chemical Biology Seminar, Yale University, New Haven, USA, 4/11, 2019
6. Drug Discovery Chemistry, Constrained Peptides, San Diego, USA, 4/4, 2018
7. 32nd Annual Symposium of The Protein Society, "Beyond 20 Amino Acids: Unnatural mutagenesis" Boston, USA, 7/8, 2018
8. 2018 Genetic Code Expansion Conference, Oregon, USA, 9/10, 2018
9. NYU-Nature Conference on Chemical Biology, New York, USA. 8/13-14, 2018
10. Japanese Society of Synthetic Organic Chemistry Symposium in Kasai section, Osaka, Japan, 9/27, 2018
11. AsiaTIDES Plenary Lecture, Kyoto, Japan, 2/21, 2017
12. Gordon Research Conference, Translation Machinery in Health & Disease,

- Houston, USA, 3/22, 2017
13. Symposium and celebrations of the 25th anniversary of the Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Germany, 7/1, 2017
  14. 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Lake Arrowhead, California, USA, 6/3, 2017
  15. Dutch peptide symposium 2017, Eindhoven, Netherlands, 6/8, 2017
  16. The 8th Takeda Science Foundation International Symposium on PharmaSciences, Osaka, Japan, 1/21, 2016 「Nomtraditional peptides and pseudo-natural products」
  17. Banyu-Fukuoka Symposium, Fukuoka, Japan, 4/23, 2016 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  18. International RNA meeting 2016, Kyoto, Japan, 6/29, 2016 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  19. Banyu-Sapporo Symposium, Sapporo, Japan, 7/2, 2016 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  20. EMBO Conference-Chemical Biology, Heidelberg, Germany, 9/2, 2016 「A RaPID way to discover pseudo-natural peptides for therapeutic uses」
  21. Joint International Symposium on TGF-beta and Cancer, Japan, 1/11, 2015 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  22. Japan-France Symposium on Molecular Technology, Paris, 3/9, 2015 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  23. Annual Meeting of the Japanese Chemical Society, 3/26, 2015 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  24. University of British Columbia, Simon-Fraser, and Victoria, triangle seminar tour, Canada, 4/7-4/9, 2015 「A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides」
  25. Gordon Research Conference, High Throughput Chemistry and Chemical Biology, New Hampshire USA, 6/18, 2015 「Pseudo-Natural Products and Peptides for Therapeutic Applications」
  26. The Origin 2014, Nara, Japan, 7/10, 2014 「The origin of tRNA aminoacylation ribozymes and beyond」
  27. Soyaku (drug development) seminar, Yatsugatake, Japan, 7/23, 2014 「**非古典・特殊ペプチド創薬のススメ**」
  28. Switzerland-Japan Chemical Biology Symposium, Bern, Switzerland, 8/1, 2014 「A RaPID way to discover bioactive macrocyclic peptides」
  29. Japanese Peptide Society Symposium, Akabori Memorial Award 2014 Lecture, Tokushima, Japan, 10/22, 2014 「Natural Product-Inspired Peptides: Ribosomal Synthesis and Discovery of bioactive Species」
  30. Development and Application of Natural Products, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 11/05, 2014. A RaPID way to discover bioactive pseudo-natural peptides

〔その他〕

研究室 HP (<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/bioorg/>)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。