

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月10日現在

環状最小ペプチド酵素の創製

Generation of minimal peptide catalyts
based on the macrocyclic scaffold

課題番号：26220204

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授



研究の概要

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、様々な触媒機能をも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」の探索とも言える基礎研究提案でもある。

研究分野：生体分子科学

キーワード：ペプチド、酵素、ケミカルバイオロジー

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。その触媒活性部位は、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、どのようにして複雑な酵素が進化したか、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、まさに気の遠くなるような稀さになる。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) を合成することはできなかつたと考えられ、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 (α -ヘリックスや β -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にデザインした、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、原始翻訳系の伸張能力を考慮すると、未だ上述の進化の謎に迫れたとはいえない。

2. 研究の目的

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、様々な触媒機能をもつペプチド分子を RaPID システムを用いて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」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) 個々の大環状ペプチド触媒の反応機構及び構造の解明
- の3つを達成目標に掲げる。

3. 研究の方法

本研究計画は、(1)~(3)の目標に沿って、菅研でもつ環状ペプチドライブラリーを翻訳合成する FIT システム、および様々な機能をもつペプチド分子を探索することのできる RaPID システムを駆使し、目的の環状ペプチド触媒の同定を行う。

4. これまでの成果

- (1) 3次元空間を生み出す大環状ペプチド
2環大環状ペプチドライブラリーの構築では、これまでに菅研究室で培ったチオエーテ

ル 4 つのシステイン残基を単にペプチド配列に配置した場合はランダムに環状化が起き得るのに対し、この方法論では 2 環の環状化パターンを完全に制御できる。したがって、本計画ではこの方法論を周到した翻訳合成により 2 環大環状ペプチドペプチドライブラリーを構築し、RaPID システムへと適応させることとした。

3 環大環状ペプチドに関しては、上記の 2 環大環状化の方法論をさらに発展させ、2 位のシステイン残基の下流に 3 つのシステイン残基を配置した ($3 < n < m < o$: 2 環大環状ペプチドの配列デザインからさらに o 位のシステイン残基が新たに加わったデザインで、最大長 30 残基を想定)。また、自発的なジスルフィド結合による環状化に代わり、1,3,5-トリス(プロモメチル)ベンゼン (TBMB) の投入による 2 位システイン残基と m 位ならびに o 位のシステイン残基のトリプルチオエーテル架橋を行い、3 次元的に極めて複雑な構造を有する 3 環架橋型大環状ペプチドの構築が可能となった。

本計画は、ほぼ当初の狙い通りに研究が進み、すでに論文化して下記に発表した。

(2) 触媒活性種のセレクション

本研究は、セレクション手法を用いるため、ハイリスク・ハイリターンの研究であることから、如何にそのリスクを低減するために綿密計画を練り、準備をするかが重要な鍵となる。本研究では、申請時の計画に沿って、①レドックス触媒、②キナーゼ、③アシルトランスフェラーゼ、④糖転移触媒の自己修飾型 (*cis-acting*) の大環状ペプチド触媒活性種の探索を同時に進行させてこととした。以下、全ての項目について試みているが、紙面の制限から③アシルトランスフェラーゼについてのみ記述する。

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) は、生命活動における不可欠な修飾である。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する。そこで本計画では、ビオチンチオエステル誘導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とした。ビオチンチオエステル誘導体としては、当研究室で合成実績のある ABT (amino-derived benzyl thioester) を用い、合成した。環状ペプチド

ライブラリーを用いて、活性種濃縮を試みた結果、望みの活性種の単離に成功した。

5. 今後の計画

アシルトランスフェラーゼ活性をもつ環状ペプチドが同定できたことは極めてエンカレッジングであり、この研究戦略が妥当であることを示唆しており、今後も引き続き他の触媒の同定に向け、検討を続ける。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

“Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation”, T. Katoh, K. Tajima, H. Suga*, **Cell Chemical Biology**, *24*, 46-54 (2017).

“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).

“A human microRNA precursor binding to folic acid discovered by small RNA transcriptomic SELEX”, N. Terasaka, K. Futai, T. Katoh, H. Suga*, **RNA**, *22*, 1918-1928 (2016).

“tRid, an enabling method to isolate previously inaccessible small RNA fractions”, K. Futai, N. Terasaka, T. Katoh, H. Suga*, **Methods**, *106*, 105-111(2016)

“Essential structural elements in tRNA^{Pro} 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).

“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).

受賞

平成 27 年度 文部科学大臣表彰科学技術賞
平成 28 年度 読売テクノ・フォーラム ゴールド・メダル賞
平成 28 年度 日本イノベーター大賞
平成 28 年度 Max-Bergmann-Medaille

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/biorig/index.html>