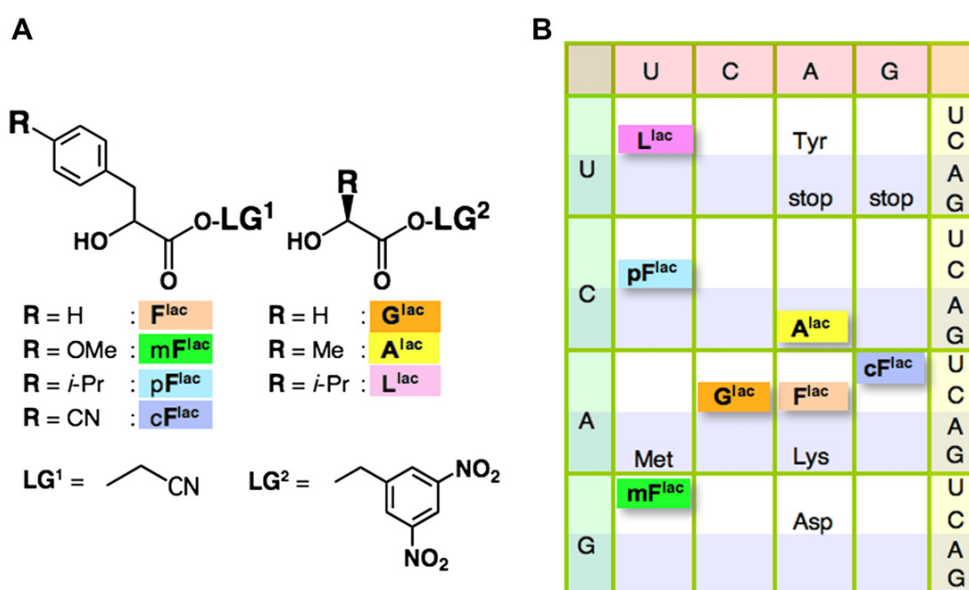


## 「RaPID システムで入れられる非天然アミノ酸の個数は？」

組み込む非天然アミノ酸の個数を制限する要因については分かりませんでした。

発表中ではペプチドの構成要素として天然アミノ酸と非天然アミノ酸に注目していましたが、FIT システムはヒドロキシ酸なども構成要素にすることができ、これを組み込んだポリエステル合成では7つのヒドロキシ酸に対応するコドンができるよう reprogramming を行った例が報告されていました。



**Figure 2. Genetic Code Reprogramming for mRNA-Directed Polyester Synthesis**

(A) Chemical structure and abbreviation of  $\alpha$ -hydroxy acids used in this study. F<sup>lac</sup>, phenyllactic acid; mF<sup>lac</sup>, *p*-methoxyphenyllactic acid; pF<sup>lac</sup>, *p*-isopropylphenyllactic acid; cF<sup>lac</sup>, *p*-cyanophenyllactic acid; G<sup>lac</sup>, glycolic acid; A<sup>lac</sup>, lactic acid; L<sup>lac</sup>, isopropylactic acid. The abbreviations used are based on structurally similar amino acids. The stereochemistry of pF<sup>lac</sup>, mF<sup>lac</sup>, and cF<sup>lac</sup> is racemic, whereas that of other  $\alpha$ -hydroxy acids is *S* configuration. All phenyllactic acid derivatives bear a cyanomethyl ester group (LG<sup>1</sup>) and are charged onto tRNAs shown in Figure 3 using eFlexiresin, while others bear a 3,5-dinitrobenzyl ester group (LG<sup>2</sup>) and are charged onto the tRNAs using dFlexiresin.

(B) The reprogrammed genetic code used in this study.  $\alpha$ -hydroxy acids assigned to the respective triplets are color-coded as shown.

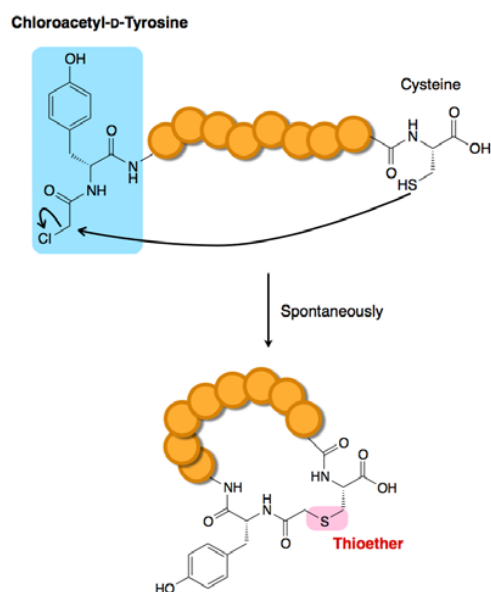
(Ohta, A., et al. 2007. *Chem. Biol.*, 14(12), 1315-1322. より引用)

「開始コドンのクロアセチルは主鎖から出ているのか（側鎖から出ているのなら graft した時も擬似環状構造ではなく、完全な環構造にできるのか）？」

クロアセチル基は主鎖の N 末端に組み込んでいます。またこの官能基は Cys との反応により thioether を形成するために必要(下図)となります初期検討では 2-ブロモアセチル基も試されていたようですが、速い分子間反応に起因した望ましくない thioether が生成してしまったようです。(Molecules. 2013, 18, 3510.)

また graft 後については非天然アミノ酸を構成要素とできないため、クロロアセチルを持つようなタンパク質を生成することはできません。しかし環構造に近づける取り組みとして、論文中では環状ペプチドのファーマコフォア配列の両端(タンパク側)を Cys にして、生成後にジスルフィド結合で環構造にするという取り組みがなされていました。(これにより、標的タンパク質との親和性の向上が見られたものもありました。)

**Figure 4.** Macrocyclization by post-translational thioether-ring closure [36,45]. A chloroacetyl-amino acid incorporated at the *N*-terminus using the FIT system spontaneously reacts with a downstream Cys to generate a macrocyclic thioether bond.



(*Molecules*. 2013, 18, 3511. より引用)

「graft した後の活性は事前に予測できるのか。計算科学的なアプローチはできるのか。」

Graft 後のタンパクの活性については、今回紹介した論文(Sakai, K., et al. 2022, *Nat. Biomed. Eng.* 1-13.) を見る限りでは事前の予測は行っていませんでした。実際今回の実験では候補となる位置にペプチドを graft したタンパクを実際に発現させてから活性評価を行っており、それらの結晶構造を撮ってから構造的考察をするという流れで書かれています。活性は組み込むペプチドと足場タンパク質の組み合わせに依存するようです。

また構造の予測についても本分中に言及はありませんでした。(今回の話とは直接関係がありませんが、環状ペプチド自体も溶媒中では一定の構造をとるわけではないようです。

[Takeuchi, K., et al. 2021. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 133(12), 6641-6646.]

「Lasso-Graft の originality はどこにあるのか。(完全に菅研が開発した技術なのか、共同研

### 「究先の独自技術を組み合わせることで開発されているのか」

Lasso-graft は菅研究室とペプチドドリーム の RaPID システムをもとにしており、環状ペプチドのファーマコフォアを組み込むという戦略自体は大阪大学蛋白質研究所の高木教授のグループで考案されたものようです（以下参照）。

“RaPID 法で得られる環状ペプチドは、10 の 12~13 乗という膨大な多様性をもつライブラリーのなかから選択されるために、その十数残基のひとつの領域に標的結合を達成するのに十分な三次元的構造がすべて内包されているため、高木教授らの研究グループはこれを単純にタンパク質表面のループに挿入して提示するという方法を考案しました。

(<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/achievements/pr20210309/> より引用)。

また高木教授らの研究グループでは構造生物学やタンパク質工学を中心とした研究がされており、セミナー中で紹介した標的タンパク質である PlexnB1 や MET については以前から研究がなされていたようです。Lasso-graft でグラフトされる cyclic peptide についても共同研究が行われていたようであり、RaPID 法を元にした共同研究の延長で Lasso-Graft 法が開発されたと考えられます。

### 「Genetic Code Expansion との違いは何か。」

RaPID 法の中で Flexizyme を用いて遺伝暗号に非天然アミノ酸を組み込むこと (FIT システム) について、これは Genetic Code Expansion の一つの方法として考えられているようです。Genetic Code Expansion は、非天然アミノ酸を tRNA に組み込んでリボソームにより翻訳させる技術のことであり、tRNA への組み込み手段がいくつかある中で FIT システムではリボザイムの一種である Flexizyme を用いているという説明の review がありました。

(Shandell, M. A., et al. 2021. *Biochemistry*, 60(46), 3455-3469.)

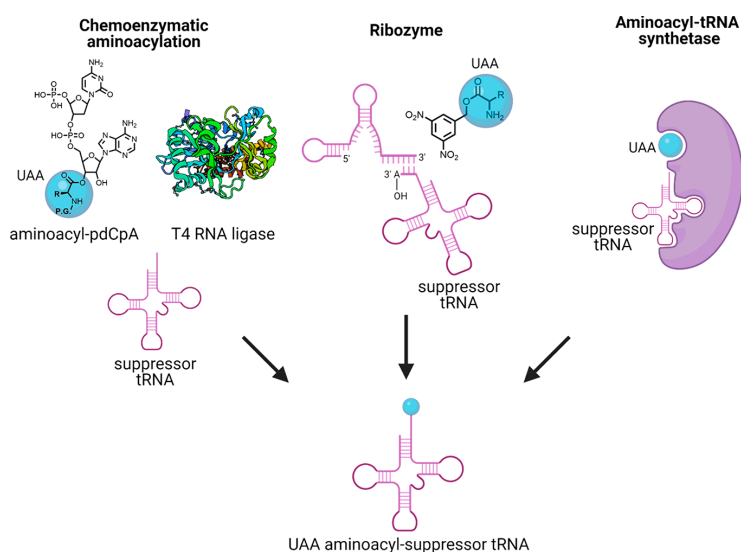


Figure 4. General methods for misacylating tRNA. P.G., protecting group.



(Lipovsek, D., et al. 2004. *J. Immunol. Methods*, 290(1-2), 51-67.より引用)

「OBOC ディスプレイのライブラリサイズの制限になる要因はなにか。」

2015 年時点で OBOC ディスプレイによる環状ペプチド合成の化合物ライブラリサイズについて  $10^7$  程度であるとの記述がありました(Qian, Z., et al. 2015. *Peptide Libraries: Methods and Protocols*, 39-53.)。また、ライブラリサイズの事実的な制約になるのはライブラリ作成後にターゲットとの親和性を調べる段階にあるようです。ライブラリとなる化合物が担持されたビーズ上でスクリーニングを行う際に、ビーズ上の化合物密度が高く (~100mM)、そのためターゲットはビーズ表面上の複数のリガンドと同時に相互作用(弱い相互作用や非特異的な相互作用も含む)します。その結果、最初にヒットしたビーズ(通常、数十から数百)を個別に再合成し、溶液中でその活性を測定しなければならず、これが非常に律速となる段階であるとともに、環状ペプチドの構造を同定することも困難であるようです。

また OBOC 法は combinatorial chemistry の一種であるようですが、combinatorial chemistry についての総説をみたところ、「スプリット合成法では必ずしも全ての組み合わせのペプチドが得られるわけではなく、全ての組み合わせのペプチドがライブラリ中に存在するようにするためには、組み合わせ数より過剰量のビーズを使う必要がある。これは統計学的に計算されており、10 種類のアミノ酸で構成されるテトラペプチドのライブラリ ( $10^4$ 通り)を 99%の信頼度で全ての組み合わせが存在するようにするには最低 5 万個のビーズが必要になる。」との記述がありました。(工藤一秋.(1997). コンビナトリアル化学. 生産研究: 東京大学生産技術研究所所報= Journal of Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 49(3), 131-138.) この記述からも、ライブラリサイズの拡大には相当量のビーズ量が必要となり、事実上の制限となることが類推できます。

「Lasso-Graft では RaPID 法と異なり非天然アミノ酸が組み込まれていないが、非天然アミノ酸を組み込まないことについて。」

調べた限りでは該当する内容の記述を見つけられなかったため、わかりませんでした。

「MET 活性化が脳において神経保護作用を果たすと述べられていたが、具体的に神経保護作用とは何か。」

元論文を当たったところ、HGF-MET シグナルの下流で神経細胞のアポトーシス抑制があるようです。より詳しくは、HGF-MET シグナル→Erk (または PI3K/Akt)→アポトーシスという経路が示されていました。(Desole, C. et al. 2021, *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 683609.)

### 「一般的な Grafting approach と比較した Lasso-Graft の長所、また LieD と Lasso-Graft を比べてまとめて」

一般的な Grafting approach の目的としては「足場としてのタンパク質にペプチドを埋め込むことにより、ペプチドの安定性の向上」にあると言われています。(Wang, C. K., et al. 2018. *Nat. Chem. Biol.*, 14(5), 417-427. ) Lasso-Graft もこの特徴が当てはまりますが、Lasso-Graft では特に de novo で見つけてきた特異性の高い環状ペプチドを殆ど構造を失わずに足場タンパク質と融合させることができるという点が長所であると考えられます。

また Lasso-Graft のコンセプトとしては「環状ペプチドをタンパク質に(擬似的に)埋め込んだ構造で発現させ、ペプチドリガンドによりタンパク質を機能付加する」ということも言えると思います。この点で LieD の「LANA ペプチドを eDHFR の非構造領域に埋め込んだような融合タンパクを発現させ、LANA により eDHFR がヒストン選択的に集積するという機能が付加される」という特徴は類似していると思います。しかしながら、Lasso-graft が「細胞外タンパク質をターゲットとする」ことや「ペプチドとタンパク質の組み合わせに終始した戦略である」のに対し、LieD では「細胞内タンパク (ヒストン) をターゲットとする」ことや「化学触媒の機能付加(ligand-directed でターゲティング)をする」という点で目的が異なっているのではないかと思います。