戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)
日本－フランス共同研究
終了報告書　概要

1. 研究課題名：「ハイブリッド 3 次元構造体の創製分子技術」
2. 研究期間：2014 年 12 月～2018 年 3 月
3. 主な参加研究者名：

日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	菅　裕明	教授	東京大学大学院理学系研究科	研究全体の総括
研究参加者	Joseph Rogers	特任研究員	東京大学大学院理学系研究科	フォールダマーを含むペプチドの翻訳研究
研究参加者	Ata Abbas	特任研究員	東京大学大学院理学系研究科	フォールダマーを含むペプチドの翻訳研究
研究参加者	Song Xiao	博士課程後期大学院学生	東京大学大学院理学系研究科	フォールダマーに対するペプチドセレクション
研究期間中の全参加研究者数		4名		

相手側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Ivan Huc	Director	CNRS	研究全体の総括
研究参加者	Sunbum Kwon	Researcher	CNRS	フォールダマーの合成
研究参加者	Simon Dawson	Researcher	CNRS	フォールダマーの合成
研究期間中の全参加研究者数		3名		

4. 共同研究の概要

本研究計画では、CNRS・Ivan Huc 博士の研究グループと東大・菅裕明博士の研究グループが、日仏共同研究チームをつくることで、これまでの常識を破る 3 次元構造体を創製する分子技術を開発する。前者のグループは、フォールダマーと呼ばれる極めて安定なヘリックス構造、すなわち剛直性を付与した 3 次元人工分子の創製技術と実績をもつ。一方、後者のグループは、世界屈指の技術、翻訳系を用いた大環状特殊ペプチドを合成する技術をもち、これまでにも薬剤探索に大きな成功をもたらした。この日仏共同研究チームは、両研究者の技術を斬新に融合し、構造の剛直性と柔軟性を併せ持った全く概念の新しい機能性 3 次元構造体を創出する分子技術開発に挑んだ。

5. 共同研究の成果

5-1　共同研究の学術成果

フォールダマーの剛直性を調整することで、フォールダマーで開始したペプチドを翻訳合成できることがわかった。これはある程度大きな分子でも、リボソームトンネルの中を通過し合成できることがわかった。さらに、菅らが開発してきた環状化技術を組み合わせることで、フォールダマーを含む環状ペプチドの合成が可能であることも示した。その環

状フォールダマー・ペプチドハイブリッド分子の構造解析をした結果、フォールダマーはヘリカル構造を維持したままペプチドが環状化していることが判明した。これは世界初の成果であり、2018 年に Nature Chemistry に論文として掲載され、また News&Views にもブレイクスルートピックスとして紹介された。

5-2　国際連携による相乗効果

本研究では、フランスチームと日本チームのそれぞれの技術と知識を駆使して研究を進め、まさしくシナジーからのみ生まれる成果として、当初計画の 3 つの計画が実現できたと自負している（一部は未発表のため、現時点での公表は控える）。しかも、成果は極めて独創性の高いものであり、分子技術としての新たな 1 ページを作れたと考えている。また、現在検討をしているフォールダマー構成モノマーの翻訳伸長に関する検討、に関しては、さらなる共同研究を継続していく予定である。

5-3　共同研究成果から期待される波及効果

上述の Nature Chemistry に発表した研究成果は極めてインパクトが高く、これまで誰もレポートされていない人工構造体フォールダマーを組み込んだ特殊環状ペプチドの翻訳合成に成功した。特にフォールダマー部分は疎水性が高く、且つ構造的な安定性が担保されていることから、ペプチド配列を置き換えた分子として、ペプチド配列をランダム化した環状ペプチドライブラリーの構築が可能となり、そこから生物活性を持ちうる（例えば標的タンパク質に結合し、且つ膜透過性ももつ）新しいハイブリッド分子の創製に繋がる可能性があり、分子技術として大きな期待が持てる。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)
Japan－France Joint Research Program
Executive Summary of Final Report

1. Project Title：「 Molecular technologies for hybrid folded architectures 」
2. Project Period：December, 2014 ～ March, 2018
3. Main Participants：

Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role
PI	Hiroaki Suga	Professor	University of Tokyo	Director of the entire project
Collaborator	Joseph Rogers	Researcher	University of Tokyo	Ribosomal synthesis of peptides containing foldamers
Collaborator	Ata Abbas	Researcher	University of Tokyo	Ribosomal synthesis of peptides containing foldamers
Collaborator	Song Xiao	Student	University of Tokyo	Selection of peptides against foldamers
Total number of participating researchers in the project: 4				

France-side

	Name	Title	Affiliation	Role
PI	Ivan Huc	Director	CNRS	Director of the entire project
Collaborator	Sunbum Kwon	Researcher	CNRS	Synthesis of foldamers
Collaborator	Simon Dawson	Researcher	CNRS	Synthesis of foldamers
Total number of participating researchers in the project: 3				

4. Summary of the joint project

This interdisciplinary project aimed at developing a new molecular technology that combines the benefits of the high conformational stability and structural predictability of aromatic amide foldamers, and the powerful in vitro expression and selection of peptides using the Flexible In-vitro Translation (FIT) system. The project demonstrated the ability of stable foldamer helices to template the folding of short peptides. Remarkably, it was found that the ribosome tolerates the presence of foldamer appendages on peptides during translation of mRNA into peptidic sequences. The benefit of the presence of the foldamers being that they carry folding information. This opens up the perspective of achieving directed evolution of peptide-foldamer hybrids with the idea that a hybrid can achieve more than a peptide alone or a foldamer alone. Eventually, ligands for difficult targets based on these hybrids may be identified for diagnostic or therapeutic purposes.

5. Outcomes of the joint project

5-1 Intellectual Merit

The project delivered a number of foldamer sequences of varying lengths and propensity to adopt helical conformations. It demonstrated their successful attachment to a tRNA by means of an amino acid. When this tRNA loaded with a foldamer was used as the initiation unit for in vitro peptide translation, peptides were produced that possessed the foldamer as

an N-terminal attachment. Further studies showed that foldamers were also integrated during ribosomal peptide synthesis as an amino acid side chain attachment. The benefit of appending the foldamers to these short peptides comes from the folding information that the foldamer carries, which allows one to induce defined conformations in the peptide, as was demonstrated in macrocyclic foldamer-peptide hybrids. These results go far beyond what was expected at the start of the project and demonstrate a high tolerance of the ribosome for non-peptidic entities. Peptides are prototypical biologically active molecules but also have inherent limitations including a poor bioavailability and fast biodegradation. It is expected that foldamer-peptide hybrids offer opportunities for applications where peptide alone or foldamers alone would not work, and that ribosomal expression of these hybrids will accelerate the discovery process.

5-2 Synergy through the Collaboration

The technologies borne by the French and Japanese teams are very unique to each of them and hav
e little equivalent throughout the world. The advances generated by the project were so at the interface between the two technologies, taking advantage of both. The scientific results obtained are unique in this respect and could have hardly been produced by other combinations of research groups throughout the world. There has thus be very high synergism. Both sides became familiar with the capabilities of the technology of the other side.

5-3 Potential Impacts on Society

Approaches for expanding the range of chemical entities that can be produced by the ribosome may accelerate the discovery of molecules that can perform functions for which poorly folded, short peptidic sequences are ill suited. The discovery that the ribosome accepts objects far larger and distinct from peptides than those previously considered has broad implications. It invites to further exploration of the ribosome’s capabilities and bodes well for applications in e.g. therapeutics and diagnostics.

共同研究における主要な研究成果リスト

1. 論文発表等

＊原著論文（相手側研究チームとの共著論文）

1. Joseph M Rogers, Sunbum Kwon, Simon Dawson, Pradeep K. Mandal, Hiroaki Suga* and Ivan Huc*, "Ribosomal synthesis and folding of peptide-helical aromatic foldamer hybrids", **Nature Chemistry** 10, 405-412, 2018. doi:10.1038/s41557-018-0007-x

＊原著論文（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文）

1. K. Iwasaki; Y. Goto; T. Katoh; T. Yamashita; S. Kaneko; H. Suga, "A Fluorescent Imaging Probe Based on a Macrocyclic Scaffold That Binds to Cellular EpCAM.", **Journal of molecular evolution**, 81, 210-217, 2015. doi:10.1007/s00239-015-9710-z
2. J.M. Rogers; H. Suga, "Discovering functional, non-proteinogenic amino acid containing, peptides using genetic code reprogramming.", **Organic & biomolecular chemistry,** 13, 9353-9363, 2015. doi:10.1039/C5OB01336D
3. N.K. Bashiruddin; M. Nagano; H. Suga"Synthesis of fused tricyclic peptides using a reprogrammed translation system and chemical modification." **Bioorganic chemistry**, 61, 45-50, 2015. doi:10.1016/j.bioorg.2015.06.002
4. N.K. Bashiruddin; H. Suga "Construction and screening of vast libraries of natural product-like macrocyclic peptides using in vitro display technologies." **Current opinion in chemical biology**, 24, 131-138, 2015. doi:10.1016/j.cbpa.2014.11.011
5. N. Terasaka; Y. Iwane; A.S. Geiermann; Y. Goto; H. Suga, "Recent developments of engineered translational machineries for the incorporation of non-canonical amino acids into polypeptides." **International journal of molecular sciences**, 16, 6513-6531, 2015. doi:10.3390/ijms16036513
6. Y. Iwane; A. Hitomi; H. Murakami; T. Katoh; Y. Goto; H. Suga, "Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes." **Nature chemistry**, 8, 317-325, 2016. doi:10.1038/nchem.2446
7. T. Katoh; I. Wohlgemuth; M. Nagano; M.V. Rodnina; H. Suga, "Essential structural elements in tRNA(Pro) for EF-P-mediated alleviation of translation stalling." **Nature communications**, 7, 11657, 2016. doi:10.1038/ncomms11657
8. R. Maini; S. Umemoto; H. Suga "Ribosome-mediated synthesis of natural product-like peptides via cell-free translation." **Current opinion in chemical biology**, 34, 44-52, 2016. doi:10.1016/j.cbpa.2016.06.006
9. Y. Matsunaga; N.K. Bashiruddin; Y. Kitago; J. Takagi; H. Suga, "Allosteric Inhibition of a Semaphorin 4D Receptor Plexin B1 by a High-Affinity Macrocyclic Peptide." **Cell chemical biology,** 23, 1341-1350, 2016. doi:10.1016/j.chembiol.2016.09.015
10. D.W. Hwang; N. Bahng; K. Ito; S. Ha; M.Y. Kim; E. Lee; H. Suga; D.S. Lee, "In vivo targeting of c-Met using a non-standard macrocyclic peptide in gastric carcinoma." **Cancer letters**, 385, 144-149, 2017. doi:10.1016/j.canlet.2016.10.030
11. T. Passioura; H. Suga, "A RaPID way to discover nonstandard macrocyclic peptide modulators of drug targets." **Chemical communications**, 53, 1931-1940, 2017. doi:10.1039/C6CC06951G
12. T. Katoh; K. Tajima; H. Suga, "Consecutive Elongation of D-Amino Acids in Translation." **Cell chemical biology**, 24, 46-54, 2017.

doi:10.1016/j.chembiol.2016.11.012

13. S.A. Jongkees; S. Caner; C. Tysoe; G.D. Brayer; S.G. Withers; H. Suga, "Rapid Discovery of Potent and Selective Glycosidase-Inhibiting De Novo Peptides." **Cell chemical biology**, 24, 381-390, 2017. doi:10.1016/j.chembiol.2017.02.001
14. H. Yu; P. Dranchak; Z. Li; R. MacArthur; M.S. Munson; N. Mehzabeen; N.J. Baird; K.P. Battalie; D. Ross; S. Lovell; C.K. Carlow; H. Suga*; J. Inglese* "Macrocycle peptides delineate locked-open inhibition mechanism for microorganism phosphoglycerate mutases." **Nature communications**, 8, 14932, 2017. doi:10.1038/ncomms14932
15. T. Ozaki; K. Yamashita; Y. Goto; M. Shimomura; S. Hayashi; S. Asamizu; Y. Sugai; H. Ikeda; H. Suga; H. Onaka, "Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogues expressed in vivo." **Nature communications**, 8, 14207, 2017. doi:10.1038/ncomms14207
16. R. Obexer; L.J. Walport; H. Suga, "Exploring sequence space: harnessing chemical and biological diversity towards new peptide leads." **Current opinion in chemical biology**, 38, 52-61, 2017. doi:10.1016/j.cbpa.2017.02.020
17. A. Kawamura; M. Munzel; T. Kojima; C. Yapp; B. Bhushan; Y. Goto; A. Tumber; T. Katoh; O.N. King; T. Passioura; L.J. Walport; S.B. Hatch; S. Madden; S. Muller; P.E. Brennan; R. Chowdhury; R.J. Hopkinson; H. Suga; C.J. Schofield, "Highly selective inhibition of histone demethylases by de novo macrocyclic peptides." **Nature communications**, 8, 14773, 2017. doi:10.1038/ncomms14773
18. X. Song; L.Y. Lu; T. Passioura; H. Suga, "Macrocyclic peptide inhibitors for the protein-protein interaction of Zaire Ebola virus protein 24 and karyopherin alpha 5." **Org Biomol Chem**, 15, 5155-5160, 2017. doi:10.1039/c7ob00012j
19. T. Katoh; Y. Iwane; H. Suga, "tRNA engineering for manipulating genetic code." **RNA Biol**, 1-8, 2017. doi:10.1080/15476286.2017.1343227
20. L.J. Walport; R. Obexer; H. Suga "Strategies for transitioning macrocyclic peptides to cell-permeable drug leads.", **Curr Opin Biotechnol**, 48, 242-250, 2017. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.007
21. T. Katoh; Y. Iwane; H. Suga, "Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances d-amino acid incorporation." **Nucleic Acids Res**, 45, 2017. doi:10.1093/nar/gkx1129

2. 学会発表

＊口頭発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 2 件（うち招待講演：計 0 件）

＊口頭発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 1 件（うち招待講演：計 1 件）

＊ポスター発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 0 件

＊ポスター発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 0 件

3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

・セミナー「Foldamers」主催者：菅裕明（東京大学・教授）、東京大学理学部化学本館、東京、日本、2015 年 11 月 24 日、参加人数 35 名程

4. 研究交流の実績

＊合同ミーティング

Date	Place	Partners present	Subject of the meeting
March 2015	Paris, France	Huc, Suga, Rogers	Kick off meeting
November 2015	Tokyo, Japan	Huc, Suga, Rogers, Kwon	Intermediate meeting
August 2016	Heidelberg, Germany	Huc, Suga, Rogers, Dawson	Intermediate meeting
January 2017	Paris, France	Huc	Intermediate review
June 2017	Whistler, Canada	Huc, Suga, Rogers, Kwon	Intermediate meeting
October 2017	Jyvaskyla, Finland	Huc, Suga	Intermediate meeting
April 2018	Tokyo, Japan	Huc, Suga	Final review

Note: Only face-to-face meetings are listed above. Periodic e-mail exchange and discussions on Skype have gone on during the entire project.

＊学生・研究者の派遣、受入

Date of Departure/ Return	Duration of Exchange	Name	Affiliation	Destination	Purpose
22 November ~ 2 December 2015	12 days	Sunbum Kwon	CNRS-IECB Bordeaux	Univ. Tokyo	Acquaintance with in vitro peptide expression
26 ~ 30 August 2017	4 days	Joseph Rogers	Univ. Tokyo	CNRS-IECB Bordeaux	Acquaintance with foldamer manipulation

5. 特許出願

研究期間累積出願件数：0 件

6. 受賞・新聞報道等

1. 紺綬褒章受賞、菅　裕明、2015/9
2. 読売テクノフォーラム・ゴールドメダル賞、菅　裕明、2016/4/22
3. Max Bergmann Medal 2016, Germany、菅　裕明、2016/10/11
4. 日本イノベーター大賞 2016　特別賞、菅　裕明、2016/11/16
5. 名古屋メダル　シルバーメダル、菅　裕明、2017/12/22

7. その他

特になし