

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02080

研究課題名（和文）非天然アミノ酸の導入を可能にする新型リボソーム翻訳系の構築

研究課題名（英文）Development of a ribosomal translation system that enables efficient incorporation of nonproteinogenic amino acids

研究代表者

加藤 敬行 (Kato, Takayuki)

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・准教授

研究者番号：90567760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではリボソーム翻訳によりD-アミノ酸や、 α -アミノ酸、 β -アミノ酸、N-メチルアミノ酸等の非天然アミノ酸をペプチド鎖中に効率よく導入する手法の開発を行った。さらに、この手法を活用してこれらの非天然アミノ酸を含む大環状ペプチドライブラリを構築し、mRNAディスプレイ法により様々な疾患原因タンパク質に結合する阻害剤ペプチドの取得に成功した。得られたペプチド群は非常に強い結合力・阻害活性を示した上、高い血中安定性を持つことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

D-アミノ酸や β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、N-メチルアミノ酸等の非天然アミノ酸はペプチドの安定性や標的への結合力、細胞膜透過性等の特性を向上させることができる。これらの非天然アミノ酸を含む特殊ペプチドの翻訳合成法を確立できれば、鋳型mRNAの配列を変えるだけで容易にランダム特殊ペプチドライブラリを構築することが可能になる。さらに、mRNAディスプレイ法などの配列スクリーニング手法を適用することで、薬理活性を持つ特殊ペプチドを効率的に探索できるため、非常に有効なペプチド創薬プラットフォームとなる。

研究成果の概要（英文）：We developed a methodology that enables efficient ribosomal incorporation of nonproteinogenic amino acids, such as D-amino, β -amino, γ -amino, and N-methyl-amino acids, into nascent peptides. By means of this system, we constructed macrocyclic random peptide libraries bearing those nonproteinogenic amino acids and applied them to mRNA display-based in vitro selection against various disease-related target proteins. The obtained macrocyclic peptides exhibited extremely high binding affinity, inhibitory activity, and serum stability.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ペプチド医薬 翻訳 tRNA リボソーム 非天然アミノ酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内に存在するペプチドは、基本的に 20 種類の天然型の L- α -アミノ酸のみから構成されている。天然の L 体ペプチドは血中で数分から数十分で分解されてしまうため、通常はそのまま医薬品として用いることは困難である。一方で、その鏡像体である D- α -アミノ酸や β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、N-メチルアミノ酸などの非天然アミノ酸から構成される「特殊ペプチド」は、生体内の分解酵素(ペプチダーゼ)の基質にならないため、生体内安定性が非常に高い(図1)。さらに、 β -アミノ酸や γ -アミノ酸などは天然型の L- α -アミノ酸とは異なる安定なターン構造やヘリックス構造を誘起するため、天然型ペプチドと比べてはるかに剛直な折りたたみ構造をとり、結果として標的分子への結合力や阻害活性が向上する。また、分子内水素結合形成により分子間の水素結合が減少し細胞膜透過性が向上するため、細胞内の疾患原因タンパク質を標的とすることができる。したがって、これらの非天然アミノ酸を導入した特殊ペプチドは新規ペプチド医薬の開発基盤として理想的である。

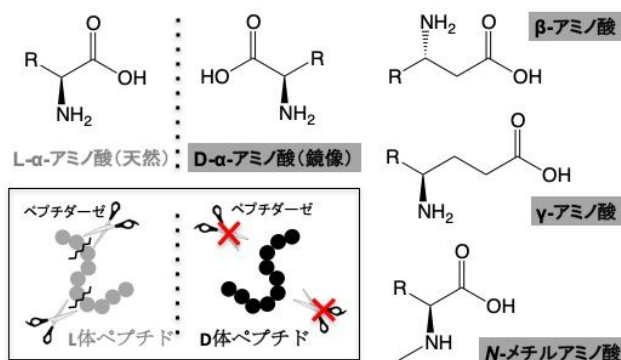


図1: 本研究で用いたアミノ酸基質

しかしながら、これらの特殊ペプチドはこれまで有機化学的な合成法によってしか合成できず、mRNA ディスプレイ法などの活性ペプチドのスクリーニング手法が適用できないため、創薬標的となる疾患原因タンパク質等に結合しうるペプチドの配列を迅速に探索することが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では D-アミノ酸や β -アミノ酸、 γ -アミノ酸、N-メチルアミノ酸等の非天然アミノ酸から構成される特殊ペプチドの翻訳合成を可能にする新型リボソーム翻訳系の開発を目指した。リボソームは L- α -アミノ酸のみを基質として利用する高い選択性を持っており、D-アミノ酸や β -アミノ酸等に対する許容性は極めて低いため、通常は D 体ペプチドや β -ペプチドなどを効率よく翻訳合成することはできない。そこで、アミノ酸をリボソームへと運搬する tRNA の構造を人工的に改変したり、翻訳因子である EF-Tu や EF-G、EF-P などの濃度を最適化することによって翻訳系の基質許容性を高め、非天然アミノ酸を基質として利用できる新型翻訳系を確立することを目指した。これにより様々な非天然アミノ酸から構成される特殊ペプチドの翻訳合成が実現できれば、鑄型 mRNA の配列を変えるだけで自由自在に、かつ短時間でバリエーションのあるペプチドライブラリを一度に作り出すことが可能になる。さらには、mRNA ディスプレイ法などの活性ペプチドのスクリーニング手法が適用できるため、ペプチド創薬研究にもたらされるインパクトは大きい。

3. 研究の方法

リボソーム翻訳においては、(1)アミノアシル tRNA のリボソームへの導入、(2)ペプチジル tRNA からアミノアシル tRNA へのペプチド鎖転移反応、(3) tRNA のトランスロケーション、の3つの素過程が順次繰り返されることによってペプチド鎖が1アミノ酸ずつ伸長してゆく。しかしながら、D-アミノ酸や β -アミノ酸などの非天然アミノ酸を導入する場合には、これら3つの素過程全てにおいて障害が生じるため、結果として効率よく翻訳ができない。すなわち、(1)や(2)の過程が天然型 L- α -アミノ酸の場合と比べて非常に遅いことと、それに伴い(3)の過程が(1)や(2)に先立って進行してしまうためにペプチジル tRNA のリボソームからの脱落が生じてしまう。従って、(1)や(2)の素過程は促進させることが必要であり、(3)の素過程は抑制することが必要となる。そこで本研究ではこれら3つの素過程における問題をまず解決し、非天然アミ

ノ酸の導入効率向上を図ることを目指した。

さらに、この新型翻訳系が確立できた段階で、D-アミノ酸およびβ-アミノ酸を含むランダムペプチドライブラリの構築を行い、mRNA ディスプレイ法を適用してEGFR や FXIIa、IFNGR1などを標的とした薬理活性ペプチドの in vitro セレクションを行った。

4. 研究成果

(1) 翻訳系においてアミノアシル-tRNAは伸長因子の1つであるEF-Tuと結合してリボソームへと輸送される。その際に、アミノアシル-tRNAはTステム部分とアミノ酸部分の2カ所でEF-Tuと結合しており、両者間の結合力はTステムに対する結合力とアミノ酸部分に対する結合力の合計となると考えられている(図2)。そして、本研究で用いたD-アミノ酸やβ-アミノ酸、N-メチルアミノ酸などの非天然アミノ酸は天然の

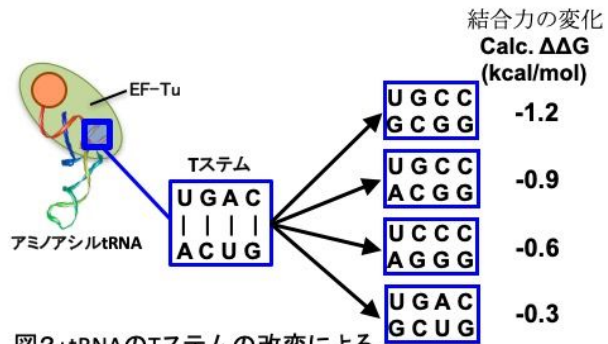


図2: tRNAのTステムの改変によるEF-Tuとの結合力の変化

L-α-アミノ酸と比べてEF-Tuとの結合力が弱いと考えられるため、tRNAのTステム部分の配列を改変しEF-Tuとの結合力を高めることによって、翻訳系への導入効率を向上させた(文献1,2,3)。

(2) これまでに、翻訳因子の一つであるEF-PがD-アミノ酸間のペプチド鎖転移反応を促進するという知見を得ており、今回EF-Pがβ-アミノ酸やγ-アミノ酸の導入においても翻訳促進効果を示すことが確認できた(文献1,2,4,5,6)。これにより、β-アミノ酸の一つであるβ-ホモメチオニンの7連続導入に初めて成功した。さらに、直鎖β-アミノ酸のみならず主鎖骨格に環状構造をもつものの導入にも成功した。このような環状β-アミノ酸は、ペプチドのターン構造やヘリックス構造を誘起する効果が高く、強固な折りたたみ構造をもつフォルダマーペプチドの構成アミノ酸として期待される。また、γ-アミノ酸に関しては過去に翻訳によってペプチド鎖中に導入できた例はなく、本研究により世界で初めて達成したことになる。

(3) 翻訳におけるトランスロケーション反応は翻訳因子の一つであるEF-Gが担っているが、EF-Gの濃度が高い条件下では誤トランスロケーションが生じやすい。今回、D-アミノ酸の連続導入において、EF-G濃度が高い条件下では、ペプチジルtRNAのリボソームからの脱落が生じ、ペプチドのトランケーションが生じることを明らかにした。この結果に基づき、翻訳系中のEF-Gの濃度の最適化を図ることによって、D-アミノ酸の導入効率の向上を実現した(文献7)。

(4) 3種類の環状β-アミノ酸を大環状ペプチドライブラリ中に組みこみ、mRNA ディスプレイ法を用いて2種類の標的タンパク質(FXIIaおよびIFNGR1)に対する阻害剤ペプチドのセレクションを行った。得られたペプチド群は結合解離定数 K_D がpMオーダーと非常に強い結合力と阻害活性を示したうえ、ヒト血清中での安定性も非常に高いことが示された。さらに、得られたペプチドのうちの1つについて標的であるFXIIaとの共結晶構造解析を行ったところ、環状β-アミノ酸の一つである(1S,2S)-2-ACHCがペプチドのγターン構造を誘起し、逆平行βシートに折りたたんでいることが明らかとなった(図

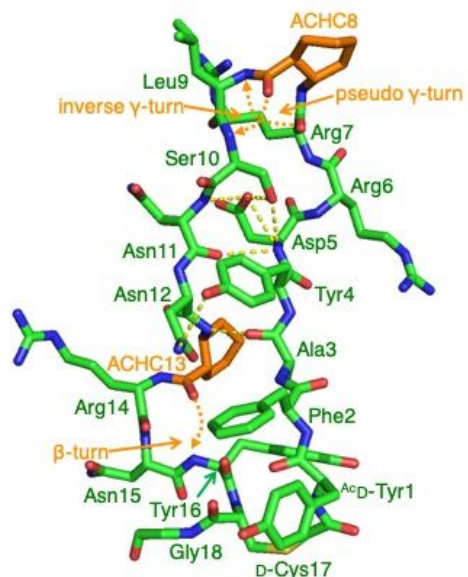


図3: γターンを介して逆平行βシートに折り畳まれたFXIIa阻害ペプチドの構造

(図

3、文献 5)。また、芳香族環状 β -アミノ酸の一種である 2-aminobenzoic acid と 3-aminothiophene-2-carboxylic acid および 2 種類の D-アミノ酸を導入した大環状ペプチドライブラリの構築にも成功し、mRNA ディスプレイ法を用いて 2 種類の標的タンパク質 (FXIIa および IFNGR1) に対する阻害剤ペプチドのセレクションを行った。その結果、FXIIa および IFNGR1 に対する強力な阻害剤を取得することに成功した。いずれの阻害剤ペプチドにおいても 2-aminobenzoic acid および 3-aminothiophene-2-carboxylic acid が阻害活性に寄与しており、ペプチドの血中安定性の向上にも寄与していることが確認された (文献 8)。また、5 種類の D-アミノ酸を含有する大環状構造ペプチドライブラリの構築も行い、ヒト EGFR を標的とするペプチドのセレクションを実施した。得られた EGFR 阻害ペプチドはヒト血清中で 24 時間以上全く分解されないことが明らかとなり、D-アミノ酸の導入がペプチドの分解耐性向上に非常に有効であることを示した (文献 9)。

< 引用文献 >

- 1) Katoh, T., Iwane, Y., Suga, H. "Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation" *Nucleic Acids Res.*, 45, 12601-12610 (2017).
- 2) Katoh, T., Suga, H. "Ribosomal incorporation of consecutive β -amino acids." *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 12159-12167 (2018).
- 3) Iwane, Y., Kimura, H., Katoh, T., Suga, H. "Uniform affinity-tuning of N-methyl-aminoacyl-tRNAs to EF-Tu enhances their multiple incorporation" *Nucleic Acids Res.*, 49, 10807-10817 (2021)
- 4) Katoh, T., Suga, H. "Ribosomal elongation of aminobenzoic acid derivatives." *J. Am. Chem. Soc.*, 142, 16518-16522 (2020).
- 5) Katoh, T., Sengoku, T., Hirata, K., Ogata, K., Suga, H. "Ribosomal synthesis and de novo discovery of bioactive foldamer peptides containing cyclic β -amino acids." *Nat. Chem.*, 12, 1081-1088 (2020).
- 6) Katoh, T., Suga, H. "Ribosomal elongation of cyclic γ -amino acids using a reprogrammed genetic code." *J. Am. Chem. Soc.*, 142, 4965-4969 (2020).
- 7) Tajima, K., Katoh, T., Suga, H. "Drop-off-reinitiation triggered by EF-G-driven mistranslocation and its alleviation by EF-P" *Nucleic Acids Res.*, 50, 2736-2753 (2022)
- 8) Katoh, T., Suga, H. "In vitro selection of foldamer-like macrocyclic peptides containing 2-aminobenzoic acid and 3-aminothiophene-2-carboxylic acid" *J. Am. Chem. Soc.*, 144, 2069-2072 (2022).
- 9) Imanishi, S., Katoh, T., Yin, Y., Yamada, M., Kawai, M., Suga, H. "In vitro selection of macrocyclic D/L-hybrid peptides against human EGFR" *J. Am. Chem. Soc.*, 143, 5680-5684 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kato Takayuki, Sengoku Toru, Hirata Kunio, Ogata Kazuhiro, Suga Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Ribosomal synthesis and de novo discovery of bioactive foldamer peptides containing cyclic amino acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemistry	6. 最初と最後の頁 1081 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41557-020-0525-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 142
2. 論文標題 Ribosomal Elongation of Aminobenzoic Acid Derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 16518 ~ 16522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c05765	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 142
2. 論文標題 Ribosomal Elongation of Cyclic α -Amino Acids using a Reprogrammed Genetic Code	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 4965 ~ 4969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.9b12280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 47
2. 論文標題 Flexizyme-catalyzed synthesis of 3'-aminoacyl-NH-tRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e54 ~ e54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 140
2. 論文標題 Ribosomal Incorporation of Consecutive -Amino Acids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 12159 ~ 12167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b07247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Hisaaki, Tsiamantas Christos, Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 58
2. 論文標題 In vitro expression of genetically encoded non-standard peptides consisting of exotic amino acid building blocks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.copbio.2018.10.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Engineering Translation Components Improve Incorporation of Exotic Amino Acids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 522 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20030522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tajima Kenya, Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Drop-off-reinitiation triggered by EF-G-driven mistranslocation and its alleviation by EF-P	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2736 ~ 2753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 144
2. 論文標題 In Vitro Selection of Foldamer-Like Macrocyclic Peptides Containing 2-Aminobenzoic Acid and 3-Aminothiophene-2-Carboxylic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 2069 ~ 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c12133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 143
2. 論文標題 Consecutive Ribosomal Incorporation of -Aminoxy/ -Hydrazino Acids with L/D-Configurations into Nascent Peptide Chains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 18844 ~ 18848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c09270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takayuki, Goto Yuki, Suga Hiroaki	4. 巻 2371
2. 論文標題 In Vitro Selection of Thioether-Closed Macrocyclic Peptide by Means of the RaPID System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 247 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1689-5_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwane Yoshihiko, Kimura Hiroyuki, Kato Takayuki, Suga Hiroaki	4. 巻 49
2. 論文標題 Uniform affinity-tuning of N-methyl-aminoacyl-tRNAs to EF-Tu enhances their multiple incorporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10807 ~ 10817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Makoto, Itoh Yasushi, Yasui Fumihiko, Munakata Tsubasa, Yamane Daisuke, Ozawa Makoto, Ito Risa, Katoh Takayuki, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Macrocyclic peptides exhibit antiviral effects against influenza virus HA and prevent pneumonia in animal models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22964-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imanishi Sayaka, Katoh Takayuki, Yin Yizhen, Yamada Mituhiro, Kawai Marina, Suga Hiroaki	4. 巻 143
2. 論文標題 In Vitro Selection of Macrocyclic D/L-Hybrid Peptides against Human EGFR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 5680 ~ 5684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c02593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Katoh Takayuki, Suga Hiroaki
2. 発表標題 Ribosomal incorporation of consecutive D- and -amino acids
3. 学会等名 RNA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Katoh
2. 発表標題 Ribosomal synthesis and de novo discovery of bioactive foldamer peptides containing - and D-amino acids
3. 学会等名 12th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦敬、加藤敬行、菅裕明
2. 発表標題 環状 -アミノ酸含有特殊ペプチドライブラリの構築と薬剤候補探索への適用
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川合茉利奈、加藤敬行、菅裕明
2. 発表標題 環状 -アミノ酸を含むヘリックスペプチドライブラリを用いた薬剤候補スクリーニング
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takayuki Katoh
2. 発表標題 Logical engineering of tRNA for incorporation of D- and -amino acids into macrocyclic peptides
3. 学会等名 4th International Conference on Circular Proteins and Peptides (ICCPP2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Katoh, Hiroaki Suga
2. 発表標題 Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA for incorporation of non-proteinogenic amino acids
3. 学会等名 27th tRNA conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Katoh, Hiroaki Suga
2. 発表標題 Ribosomal incorporation of consecutive D- and -amino acids
3. 学会等名 Ribosome 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大城 裕亮・加藤 敬行・菅裕明
2. 発表標題 細胞膜透過型Helixペプチドライブラリーの構築とその薬剤候補探索への適用
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rei Takahashi, Takayuki Katoh, Axel Innis, Hiroaki Suga
2. 発表標題 In vitro selection of antibiotic peptides that inhibit the bacterial ribosome
3. 学会等名 日本化学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------