

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02083

研究課題名（和文）全4塩基遺伝暗号翻訳システムの開発と超多様化ペプチド創薬への応用

研究課題名（英文）Development of four-base codon decoding system and its application to highly diversified peptide drug discovery

研究代表者

芳坂 貴弘（Hohsaka, Takahiro）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：30263619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、天然に存在しない多種多様な「非天然アミノ酸」をペプチドやタンパク質に導入することを可能にするために、もともと3文字からなる遺伝暗号を4文字に拡張した「4塩基コドン」をさらに発展させることを試みた。その結果、従来よりも多種類の4塩基コドンが非天然アミノ酸の導入に利用可能であることを見だし、さらに多種類の4塩基コドンの翻訳効率を一括で評価する手法も確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生物の基本原則である遺伝暗号が大幅に拡張できることを明らかにしたとともに、多種多様な非天然アミノ酸からなるペプチドやタンパク質の生合成を可能にするものである。本手法は、ペプチド創薬技術と組み合わせることで、多様な非天然アミノ酸からなるペプチドの中から特定の標的分子に結合するペプチドを取得することを可能にし、新たなペプチド医薬の取得などへの応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to make it possible to introduce a wide variety of nonnatural amino acids into peptides and proteins, we developed four-base codon decoding system in which the genetic code originally consisted of 3 letters is expanded to 4 letters. As a result, we found that a large number of four-base codons can be used for the introduction of nonnatural amino acids, and established a method for collectively evaluating the translation efficiency of four-base codons.

研究分野：生体関連化学

キーワード：非天然アミノ酸 遺伝暗号 4塩基コドン ペプチド 無細胞翻訳系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに、4塩基コドンが無細胞翻訳系において非天然アミノ酸の導入に有用であることを実証し(図1)(*J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 9778-9779 など) さらに2種類の4塩基コドンをを用いることで2種類の非天然アミノ酸を導入することにも世界で初めて成功した(*Nature Methods*, 2006, 3, 923-929 など)。原理的には、3あるいは4種類以上の非天然アミノ酸を導入することも可能ではあるが、タンパク質の改変・解析においては多種類の非天然アミノ酸の導入は必ずしも必要ではなく、また3塩基コドンとの競合が累積することで最終的な収量が非常に低下するため、それ以降さらなる遺伝暗号の拡張は検討してこなかった。

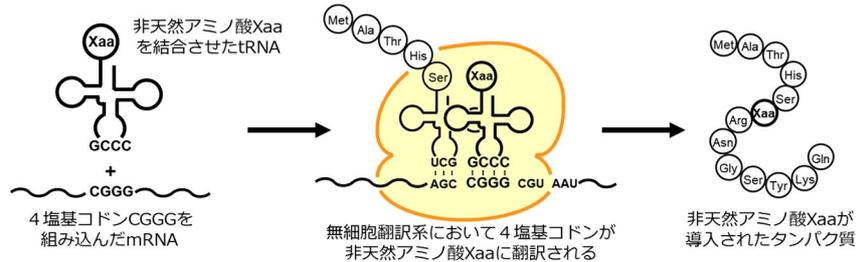


図1 4塩基コドンによる非天然アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入

一方、cDNA ディスプレイなどの遺伝情報連結型ペプチドライブラリーにおいては、得られる創薬シーズとしてのペプチドの特性は、ライブラリーのアミノ酸の多様性に大きく依存する。しかし、通常の3塩基コドン翻訳では、アミノ酸の多様性は最大でも64種類に留まる。この限界に対して、4塩基コドンは最大256種類へと多様性を飛躍的に向上できる可能性を持つ。研究代表者はこの4塩基コドンの利点を再認識し、4塩基コドンがペプチドライブラリーのアミノ酸多様性を飛躍的に向上させる唯一の方法であると考え、本研究を着想するに至った。

遺伝暗号拡張の研究動向には二つの大きな流れがあり、一つ目は、主にアンバーコドンTAGに対して非天然アミノ酸を導入する手法である。近年は種々の非天然アミノ酸に対するアミノアシル tRNA 合成酵素変異体が開発されたことで、細胞内での使用が可能になり、開発者以外の研究者にも広く普及しつつある。二つ目は、アミノ酸を除去した再構成無細胞翻訳系において遺伝暗号の再定義を行うものである。これは、化学的あるいは酵素的にアミノ酸を任意の tRNA に結合させておくことで、コドンに対して本来とは異なるアミノ酸を導入することを可能にする。この手法は、cDNA ディスプレイなどの遺伝情報連結型ペプチドセレクションと組み合わせ、ペプチド創薬のツールとして実用化されつつある。

研究代表者の4塩基コドン法は、当初は一つ目のアンバーコドン法を拡張する目的で開発し、無細胞翻訳系では効率と多重導入の点でそれを凌駕する方法として確立することができた。ただし、非天然アミノ酸用のアミノアシル tRNA 合成酵素変異体と4塩基コドンを組み合わせが容易ではないこともあり、アンバーコドン法のように細胞内への適用は普及していない。一方、二つ目の遺伝暗号の再定義に対しては、64種類全ての3塩基コドンを非天然・天然アミノ酸へ活用した例は未だ無いものの、原理的には可能でありいずれ実現されることが予想される。4塩基コドンでの遺伝暗号再定義はさらにその先に行くものであり、次々世代のペプチド創薬技術を先取りした位置づけとなる。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝暗号を4塩基へ拡張した4塩基遺伝暗号翻訳システムを構築し、多種多様な天然・非天然アミノ酸からなる超多様化ペプチドの翻訳合成技術を開発することを目的とした(図2)。このような技術はこれまで存在せず、極めて独自性・新規性の高い研究である。

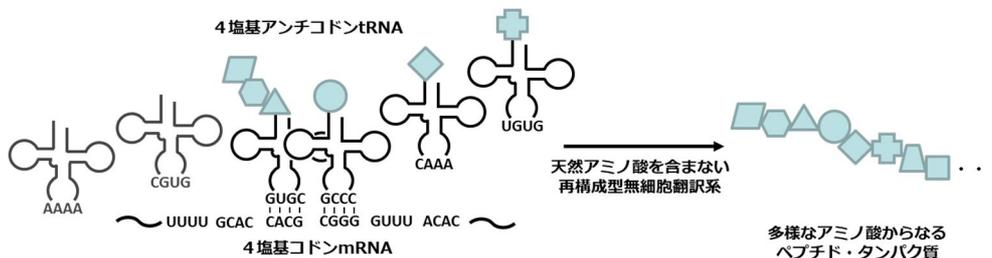


図2 4塩基遺伝暗号翻訳システムによる超多様化ペプチドの生合成

加えて本研究では、遺伝暗号拡張の可能性を学術的に探究するだけにとどまらず、その応用可能性にも注目し、特にペプチド創薬へ展開する点に大きな特徴がある。cDNA ディスプレイなどの遺伝情報連結型ペプチドライブラリーは、標的分子に結合するペプチドの取得に有用であり、実際に創薬技術として実用化されつつある。当初は天然アミノ酸からなるペプチドのみが対象であったが、非天然アミノ酸やNメチル化アミノ酸を導入することで、多様性の向上、ペプチドの環状化、プロテアーゼ耐性化なども可能となっている。

その際、ペプチドライブラリーから優れた特性を持つペプチドを取得できる可能性は、ライブラリーの多様性に大きく依存する。しかし、通常の3塩基の遺伝暗号を基本とした場合、コドンの数(64種類)が制限となり、これを超えた種類のアミノ酸を用いることは不可能である。研究代表者は、4塩基コドンの一部を組み込むことで、4種類の非天然アミノ酸を含むペプチドライブラリーの作成に成功しているが(*Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, e7)本研究ではこの戦略をさらに発展させ、4塩基コドンを多用することでアミノ酸の種類を大幅に向上させる。このことは、創薬シーズとして優れた特性を持つペプチドの取得確率を大幅に高めることを可能にする。

3. 研究の方法

(1) 4塩基コドンおよびアンチコドンを組み込んだ mRNA および tRNA の合成

発現させる遺伝子として、開始コドン、ヒスチジンタグの下流に4塩基コドンを組み込んだ配列を設計し、オリゴDNAを用いて鋳型DNAを作成した。これをT7 RNAポリメラーゼによって転写して、mRNAを作成した。一方、tRNAのアンチコドン部分を4塩基に置換したtRNA遺伝子を作成して、T7 RNAポリメラーゼによってtRNAを得た。これを化学的アミノアシル化により、各種の非天然アミノ酸を付加した。

(2) 無細胞翻訳系による4塩基コドンの翻訳

翻訳系としては、アミノ酸を含まない再構成型無細胞翻訳系(PUREsystem)を使用した。これにより、3塩基翻訳と全く競合することなく、4塩基コドンの翻訳を行うことが可能になる。最低限のアミノ酸としてメチオニンとヒスチジンのみを加え、mRNAとtRNAを添加して無細胞翻訳系で発現させた。続いて、Hisタグに対する精製を行い、翻訳生成物を単離し、質量測定(MALDI TOF-MS)および電気泳動(SDS-PAGE)により分析した。

(3) 質量分析を用いた複数の4塩基コドンの一括評価

複数の4塩基コドンを一括で評価することを可能にする手法として、4塩基コドンの種類ごとに異なる種類の非天然アミノ酸を導入するようにしておき、複数の4塩基コドンを組み込んだ遺伝子を一括で翻訳したのち、一斉分析して翻訳可能な4塩基コドンを特定できるようにした。具体的には、それぞれ異なる4塩基アンチコドンを持つtRNAに対して、*p*-フルオロフェニルアラニンなどの各種フェニルアラニン誘導体でアミノアシル化し、4塩基コドンを組み込んだmRNAの混合物を無細胞翻訳系で発現させた。精製後、質量分析(MALDI TOF-MS)によりそれぞれの非天然アミノ酸導入ペプチドのピーク強度を定量し、さらにアミノ酸の種類による質量分析の検出感度の違いを補正することで、4塩基コドンの翻訳効率を評価した。

(4) mRNA ディスプレイを用いた4塩基コドンの一括評価

本研究では、非天然アミノ酸導入ペプチドのセレクションを行うために、4塩基コドンを組み込んだmRNA ディスプレイの実験系の構築も行った。さらにこれを利用して4塩基コドンを選択できる実験系を構築し、ランダムな4塩基コドン配列の中から高効率で翻訳された4塩基コドンを特定できるようにした。具体的には、tRNAの4塩基アンチコドン部分をランダムな4塩基配列としておき、さらにビオチン化非天然アミノ酸でアミノアシル化した。一方、mRNAの4塩基コドン部分をランダムな4塩基配列として、無細胞翻訳系で翻訳させつつmRNA ディスプレイを行った。ストレプトアビジン固定化ビーズによってビオチン化ペプチド mRNA 複合体を単離して、それを鋳型として再度mRNAを作成し、mRNA ディスプレイを繰り返し行った。得られた配列と出現頻度を次世代シーケンシング(NGS)を用いて分析した。

4. 研究成果

まず Arg 由来のコドンを4塩基コドンに拡張して、非天然アミノ酸を導入したペプチドを無細胞翻訳系で発現させて、その検出を行う一連の実験系の構築を進めた。その結果、開始コドンと His タグ配列と4塩基コドンからなる遺伝子を用いて、4塩基コドンに対して蛍光標識非天然アミノ酸を導入することで、目的のペプチドを発現させて SDS-PAGE の蛍光イメージ測定により検出できることを確認した。また、通常は無細胞翻訳系を用いた場合は、Arg による3塩基としての翻訳が競合するために、限られた種類の4塩基コドンのみが翻訳されるに留まっていたが、アミノ酸を含まない再構成無細胞翻訳系を用いて Met と His のみを添加した場合には、Arg による3塩基としての翻訳が回避されて、多くの種類の4塩基コドンが効率良く翻訳されることも確認された(図3)。

さらに、His タグに対する精製を行った後に質量分析を行うことで、目的ペプチドの検出が可能であることも確認できた。一方で、質量分析の結果から予想外の副生成物の生成も観察され、4塩基コドンの翻訳において、3塩基による天然アミノ酸への翻訳以外に、新たな競合過程の存在も示唆された。4塩基コドンの翻訳過程の分析を行ったところ、4塩基コドンの翻訳と競合して、4塩基コドン上流でのペプチジル tRNA の加水分解、および、4塩基コドン下流での自発的な翻訳読み枠のずれ(フレームシフト)が起こることを新たに見出した。

さらに、すべての4塩基コドンについて mRNA および tRNA の作製を行い、アミノ酸を含まない再構成無細胞翻訳系において、非天然アミノ酸の導入の評価を行った。その結果、さらに多くの種類の4塩基コドンにおいて、実際に非天然アミノ酸の導入が認められた。ただし多種類(最大256種類)の4塩基コドンを実験条件を変えつつ評価することから、複数の4塩基コドンを一括で評価することを可能にする手法も必要とされた。

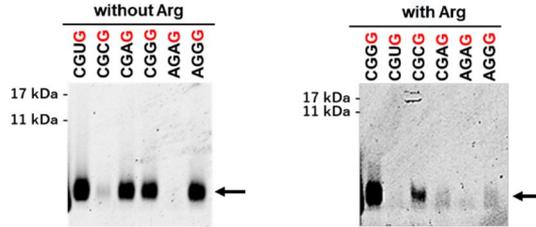
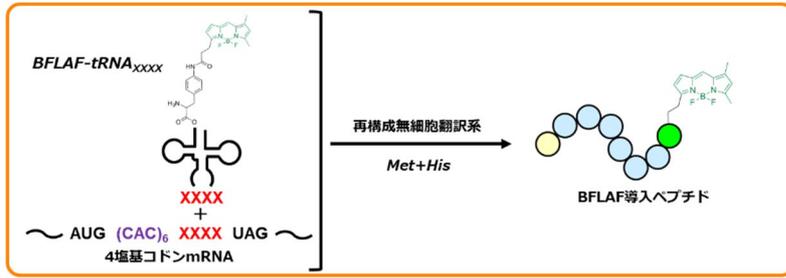


図3 再構成無細胞翻訳系における4塩基コドンの翻訳

そこで、複数の4塩基コドンを一括で評価する手法の確立を試みた。第一には、4塩基コドンごとに異なる種類の非天然アミノ酸を導入するようにしておき、複数の4塩基コドンを組み込んだ遺伝子を一括で翻訳し、その翻訳生成物混合物を質量分析によって分離検出することで、翻訳可能な4塩基コドン特定できるようにした。8種類の4塩基コドンの混合したペプチド発現mRNAと、対応する4塩基アンチコドンを持ち8種類のそれぞれ異なるフェニルアラニン誘導体を付加したtRNAを、すべて混合して再構成無細胞翻訳系に添加して、非天然アミノ酸導入ペプチドの質量分析を行ったところ、4塩基コドンの翻訳効率を反映してペプチドの発現が検出され、さらに非天然アミノ酸の種類による質量分析の検出感度の違いを補正したことで、4塩基コドンの翻訳効率を定量的に一括評価することが可能になった(図4)。

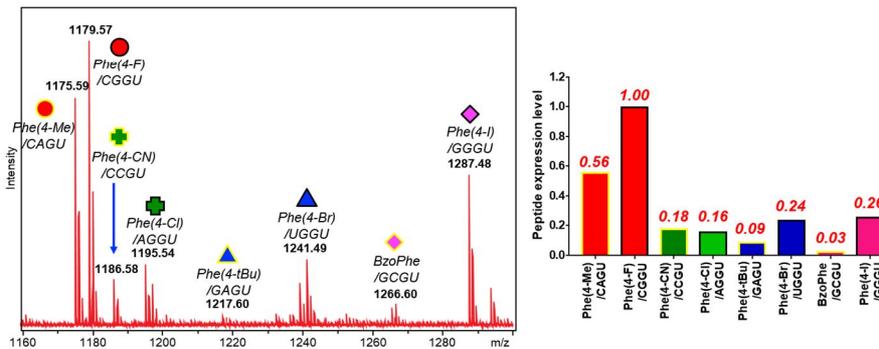
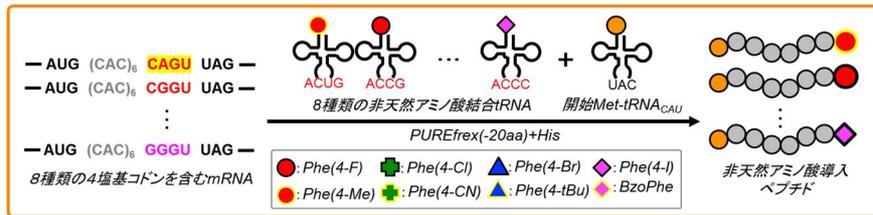


図4 質量分析を用いた4塩基コドンの一括評価

第二は、非天然アミノ酸導入ペプチドのセレクションを行うために構築したmRNAディスプレイを応用することで、翻訳可能な4塩基コドンを見分けられる実験系を構築した。ランダムな4塩基コドン配列を持つmRNAにPuromycinを付加した上で、ランダムな4塩基アンチコドンを持ちビオチン化非天然アミノ酸を付加したtRNAとともに、再構成無細胞翻訳系に添加し、mRNAペプチド複合体を形成させた。Streptavidinビーズを用いてビオチン化非天然アミノ酸の導入されたmRNAペプチド複合体を回収して、逆転写の後PCRを行い、さらにmRNAディスプレイを繰り返し行った。回収されたcDNAの塩基配列を次世代シーケンシング(NGS)で取得した結果、配列の出現頻度は4塩基コドンの種類によって大きく異なっており、高効率で翻訳可能な4塩基コドンを選別できることが明らかとなった(図5)。

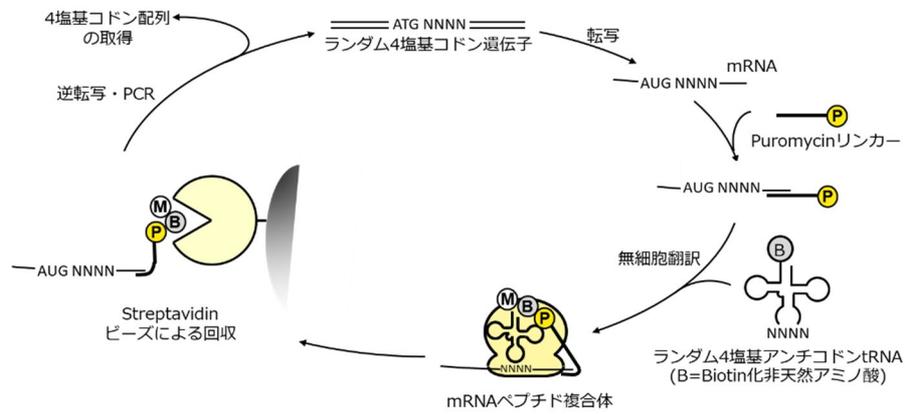


図5 mRNAディスプレイを用いた4塩基コドンの一括評価

以上、本研究により、アミノ酸を含まない再構成無細胞翻訳系において多種類の4塩基コドンが翻訳可能であることを明らかにするとともに、翻訳可能な4塩基コドンを一括評価できる手法を確立することができた。これらの成果は、4塩基コドンを用いて複数の非天然アミノ酸を導入した超多様化ペプチドの発現の基礎となるものであり、特定の標的に結合する非天然ペプチドの取得技術としての活用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamura Takashi, Inoue Masaaki, Yoshimitsu Yuji, Hashimoto Ichihiko, Ohashi Noriyuki, Tsumura Kyosuke, Suzuki Koo, Watanabe Takayoshi, Hohsaka Takahiro	4. 巻 95
2. 論文標題 Chemical Synthesis and Cell-Free Expression of Thiazoline Ring-Bridged Cyclic Peptides and Their Properties on Biomembrane Permeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 359 ~ 366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20210409	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 貴嘉、Novitasari Dian、芳坂 貴弘
2. 発表標題 アミノ酸欠如再構成無細胞翻訳系における4塩基コドンの多重探索法の開発
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 貴嘉、Novitasari Dian、芳坂 貴弘
2. 発表標題 再構成無細胞翻訳系における4塩基コドンの多重探索
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hohsaka/>

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
---------	---------