

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14332

研究課題名（和文） -アミノ酸を導入可能な基質拡張リボソームの創製

研究課題名（英文） Ribosome modification to synthesize peptides containing beta-amino acids

研究代表者

藤野 公茂 (Fujino, Tomoshige)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：00772378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生物の持つタンパク質合成装置であるリボソームに対し、進化分子工学的手法を用いることで、天然では合成できない、特殊なアミノ酸を含むペプチド合成を可能にすることを目標とした。その結果、D体アミノ酸の翻訳効率の高い変異リボソームの配列を得ることに成功した。ただし、改変したことによる構造的不安定さから、得られたリボソームを、活性を維持した状態で精製することが困難であるという課題を残した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、目的の機能を持ったリボソームを、進化分子工学によって取得する手法を開発した。この手法は、本研究で対象とした -アミノ酸・D体アミノ酸に限定されず、さまざまな特殊アミノ酸を翻訳可能なリボソームの開発に利用できる。今後、特殊アミノ酸の翻訳が自由に行えるようになれば、現在注目されている進化分子工学を利用したペプチド薬剤の開発など、実用的な分野への応用も可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was modifying ribosome, which is the organelle producing proteins in a cell, to improve the incorporation efficiency of non-proteinogenic amino acids into peptide. We successfully developed a method to pick up the desired mutant ribosome from the pool of highly diverse mutant ribosomes containing random mutations in their rRNA sequences. Although we found the rRNA sequence with an improved activity to introduce D-amino acid into peptide, the expression and purification of the mutant ribosome from E. coli cells were difficult because the structural stability of the mutant ribosome was low.

研究分野：進化分子工学

キーワード：リボソーム 無細胞翻訳系 -アミノ酸 D体アミノ酸 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

2010年代以降、非タンパク質性アミノ酸を導入した10兆種類にも達するペプチドライブラリを、翻訳系を用いて合成し、薬剤候補・分子プローブ等の機能性ペプチドを取得する研究が進められている(引用1,2)。非タンパク質性アミノ酸の中でも、 α -アミノ酸・D体アミノ酸は、ペプチドに導入されることで、ペプチドの加水分解酵素に対する耐性を上昇させることができるため、機能性ペプチドの構成要素として期待されている(引用3)。しかし、天然リボソームで α -アミノ酸・D体アミノ酸を翻訳導入する場合、ペプチド中に連続的に導入することができないという制約があるため(引用4,5)これらのアミノ酸を含む実用的なペプチドライブラリの構築は実現されていなかった。

2. 研究の目的

天然リボソームによる、 α -アミノ酸・D体アミノ酸の翻訳導入が非効率的な原因は、リボソームの活性中心の構造がこれらのアミノ酸の触媒に適応していないことであると考えられる(引用6)。そこで本研究では、リボソームの活性中心を改変し、 α -アミノ酸・D体アミノ酸を連続的に導入できる『基質拡張リボソーム』の創製を目指した。この際、リボソームは巨大で複雑な分子であるため、活性中心の構造を計算して改変することは困難と考えられた。そこで本研究では、進化分子工学的手法の1種であるリボソーム提示法(引用7)を応用することで、目的の活性を持つリボソームを人工進化させる手法を開発した。

3. 研究の方法

(1) 変異リボソームライブラリの作製: リボソームの活性中心でペプチド結合を形成する2残基のアミノ酸の周囲に位置する塩基を、変異導入箇所の候補として選定した(図1)。ここにランダムな変異を導入し、プラスミドライブラリを作製した。作製したプラスミドライブラリを大腸菌に形質転換し、変異リボソームライブラリの発現を行った。

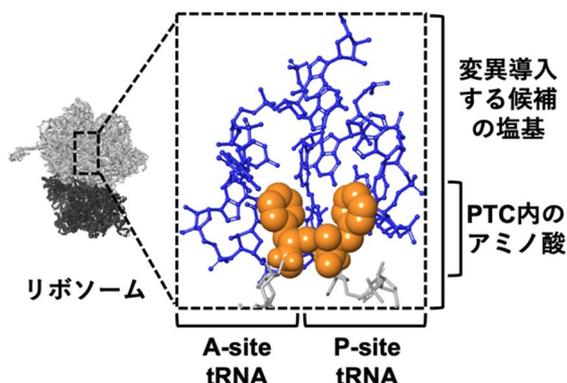


図1 リボソーム活性中心の構造と変異導入候補の塩基

(2) 基質拡張リボソームの選択: 非常に多様性の高い変異リボソームライブラリの中から、目的の活性を持つ変異リボソームを選択するため、進化分子工学的手法の1種であるリボソーム提示法を応用する手法を開発した(図2)。具体的には、まず、遺伝暗号のリプログラミングとリボソーム提示法の応用により、非タンパク質性アミノ酸を連続的に含むペプチドを、変異リボソームライブラリに提示させる。ペプチドの提示に成功したリボソームのみが、N末端のビオチン標識を用いて、ストレプトアビジン担体により回収される。この系を用いて、非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドと、通常のペプチドを翻訳させた2つの場合で、それぞれ回収を行い、次世代シーケンサによりリボソームの配列を比較した。非タンパク質性アミノ酸を用いた場合に、回収量が増加する変異リボソームが、目的の基質拡張リボソームであると判断した。

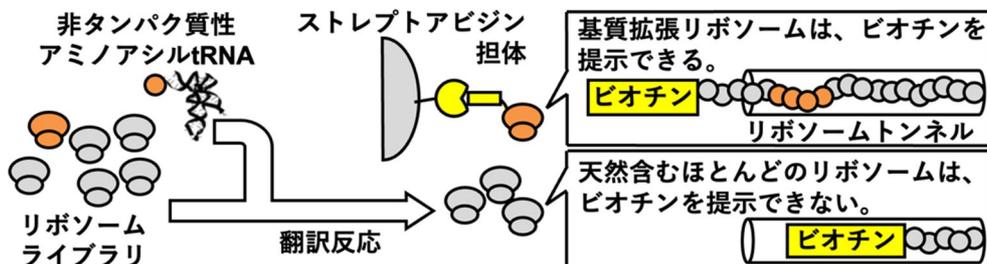


図2 基質拡張リボソームを翻訳活性に基づき選択する原理

(3) 基質拡張リボソームのD体アミノ酸連続導入活性の評価: D体アミノ酸の連続導入効率の改善が示唆されたリボソームを単独発現し、D体アミノ酸を連続的に含むモデルペプチドの翻訳合成量を定量した。

4. 研究成果

(1) 変異リボソームライブラリの作製: ランダム変異を導入するに当たっては、11箇所の塩基を選択して行なった。この場合、ライブラリに含まれる配列の理論的な多様性は、 $4^{11} = 420$ 万

種類程度となる。プラスミドライブラリ構築後、大腸菌に形質転換した際、実際に得られたコロニーは、約 880 万個であったため、420 万種類の大部分の変異リボソームが、網羅的に準備できたと考えられる。

(2) 活性に基づくリボソーム選択系の開発：本研究では、非タンパク質性アミノ酸を連続導入可能なリボソームを選択する選択系の確立を行なった。この系の有効性を確認するため、まずは L-Ala の導入活性の高いリボソームの選択を試みた。その結果、非タンパク質性アミノ酸を用いた選択による回収が大きな変異リボソームでは、モデルペプチドの合成活性も高いことが分かった(図 3)。このことは、本選択系が、活性を反映したリボソーム選択法として機能していることを示している。

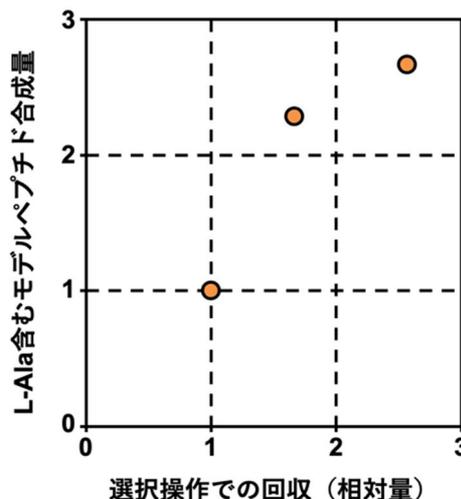


図3 リボソーム選択系での回収とペプチド合成量の相関

(3) 基質拡張リボソームの選択：確立した系を用いて、実際に -アミノ酸として hGly、D 体アミノ酸として D-Phe を用いて、リボソームの選択を実施した。非タンパク質性アミノ酸を翻訳に用いた場合に回収が高い変異リボソームは、hGly では見つからなかったが、D-Phe では、天然アミノ酸を用いた場合の 4~5 倍の回収を示した 4 種の変異リボソームが同定された。変異導入の見られた塩基は、リボソーム P-site のアミノ酸側鎖近傍に位置し、D 体アミノ酸のペプチド転移反応に関与している可能性が示唆された。

(4) 基質拡張リボソームの D 体アミノ酸導入活性評価：同定された 4 種の変異リボソームを単独発現し、D-Phe を含むモデルペプチドの翻訳合成量を定量したが、ほぼ産物が得られていないことが分かった。これらの変異リボソームについて詳細に解析すると、そのうち 1 種類では、小サブユニットが 3/4 程度欠落し、70S リボソームを形成できていないことが分かった。また、全てのリボソームの翻訳活性は、D 体アミノ酸に限らず、タンパク質性アミノ酸を用いた場合でも、天然リボソームの 1~4 割程度に低下していた。以上のことから、得られた変異リボソームは、変異導入によって構造が不安定化しやすくなっており、単独発現・精製の過程で、翻訳活性を失っていると考えられた。

(5) 本研究の今後の課題：本研究では、基質拡張リボソーム選択系の開発について達成し、420 万種類の変異リボソームライブラリから、そのアミノ酸導入活性に基づいた、リボソームの選択的回収を実現した。しかし、D-Phe を用いて選択されたリボソームは、構造不安定性の問題により、高いペプチド翻訳活性を示さなかった。この問題に対する解決策として、以下の方法が考えられる。本研究の結果から、変異導入を行なった場合に、活性への影響が少ない塩基を特定し、ここに集中的に変異導入を行うことで、得られた変異リボソームが実際には活性を發揮できないという問題を回避できるのではないかと考えられる。

(6) 本研究の副次的な成果 1：本研究では、様々な非タンパク質性アミノ酸を tRNA にアミノアシル化する必要があった。この過程は、人工リボザイムの触媒するアミノアシル tRNA 合成を利用して行なった。この時に重要になるのは、事前に、非タンパク質性アミノ酸毎に最適な反応条件を決定しておくことであるが、従来は酸性の非タンパク質性アミノ酸では、そのアミノアシル化効率測定が難しいという問題があった。これに対し、フレキシザイムの最小基質 RNA を用いた、新たなアミノアシル化効率測定法(図 4)を開発することで、簡便な測定を実現した(引用 8)。



図4 フレキシザイムの最小基質RNAを用いたアミノアシル化効率測定法

(7) 本研究の副次的な成果 2：本研究で開発する基質拡張リボソームは、非タンパク質性アミノ酸を含む薬剤ペプチド選択への応用が期待されるが、その際に必要となる薬剤標的タンパク質の、安全な調製法を確立した(図 5)。通常の大腸菌を用いた方法では、バイオセーフティレベルを満たす必要があり、実施可能な施設に限られる。今回確立した方法では、万が一漏洩しても自然界で機能しない、アミノ酸入れ替え遺伝子を構築することで安全性を担保することが可能

になった(引用9)。

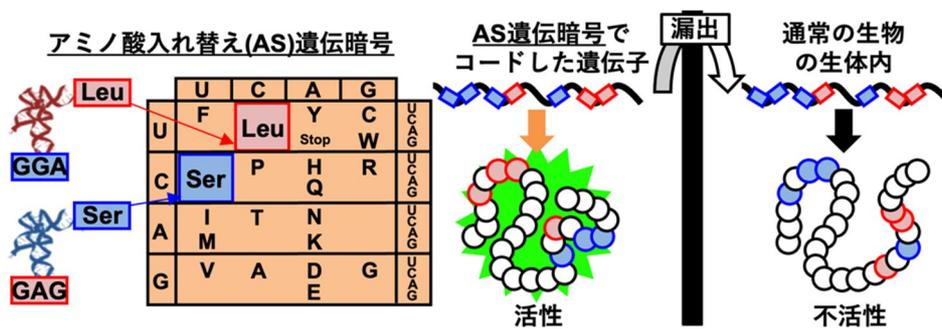


図5 アミノ酸入れ替え遺伝暗号を用いた、遺伝子漏洩の防止戦略

<引用文献>

1. N. K. Bashiruddin et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 24, 131-138.
2. T. Kawakami et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1205-1214.
3. J. Frackenpohl et al., *ChemBioChem* **2001**, 2, 445-455.
4. T. Fujino et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 1962-1969.
5. T. Fujino et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1830-1837.
6. S. Sando et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6180-6186.
7. L. C. Mattheakis et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 9022-9026.
8. T. Fujino et al., *Chembiochem* **2019**, 20(15), 1959-1965.
9. T. Fujino et al., *ACS Synth. Biol.* **2020**, 9(10), 2703-2713.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujino Tomoshige, Kondo Taishi, Suga Hiroaki, Murakami Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Exploring the Minimal RNA Substrate of Flexizymes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1959 ~ 1965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900150	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 藤野公茂	4. 巻 22
2. 論文標題 若手研究者からのメッセージ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本化学会バイオテクノロジー部会ニュースレター	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kondo, T, Eguchi, M, Kito, S, Fujino, T, Hayashi, G, Murakami, H	4. 巻 57
2. 論文標題 cDNA TRAP display for rapid and stable in vitro selection of antibody-like proteins.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2416-2419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc07541h	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 Fujino Tomoshige, Tozaki Masahiro, Murakami Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 An Amino Acid-Swapped Genetic Code.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2703-2713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00196	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 Kondo T, Iwatani Y, Matsuoka K, Fujino T, Umemoto S, Yokomaku Y, Ishizaki K, Kito S, Sezaki T, Hayashi G, Murakami H	4. 巻 6
2. 論文標題 Antibody-like proteins that capture and neutralize SARS-CoV-2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 3916-3916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd3916	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11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤野公茂, 近藤太志, 菅裕明, 村上裕
2. 発表標題 フレキシザイムの最小RNA基質の探索
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野公茂, 近藤太志, 菅裕明, 村上裕
2. 発表標題 フレキシザイムの基質となる最小RNAの探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野公茂, 秋山尚輝, 則武卓磨, 村上裕
2. 発表標題 改変翻訳系の構築を指向した変異リボソームの迅速精製法
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山尚輝, 則武卓磨, 藤野公茂, 村上 裕
2. 発表標題 迅速かつ簡便な変異リボソーム精製法
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 則武 卓磨, 藤野 公茂, 村上 裕
2. 発表標題 -アミノ酸を基質とする改変リボソーム選択系の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤野公茂, 則武卓磨, 村上裕
2. 発表標題 -アミノ酸を基質とする改変リボソーム選択法の確立
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤太志、岩谷靖雅、松岡和弘、藤野公茂、梅本駿、横幕能行、林剛介、村上裕
2. 発表標題 High-speed selection of antibody-like proteins that capture and neutralize SARS-CoV-2
3. 学会等名 The 18th Akabori Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤太志、岩谷靖雅、松岡和弘、藤野公茂、梅本駿、横幕能行、林剛介、村上裕
2. 発表標題 高速人工抗体創製法の開発とSARS-CoV-2中和抗体作製への応用
3. 学会等名 生物化学的測定研究会 第25回学術シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤太志、岩谷靖雅、松岡和弘、藤野公茂、梅本駿、横幕能行、林剛介、村上裕
2. 発表標題 SARS-CoV-2を結合・中和する人工抗体の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤野公茂、戸崎将弘、村上裕
2. 発表標題 アミノ酸入れ替え遺伝暗号の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤太志、岩谷靖雅、松岡和弘、藤野公茂、梅本駿、横幕能行、林剛介、村上裕
2. 発表標題 SARS-CoV-2由来スパイクタンパク質に対する高親和性人工抗体の高速創製
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------	---------