

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19685016

研究課題名 (和文)

リボソームによる配列制御型合成系の拡張に向けた非天然基質の合理的設計

研究課題名 (英文)

Rational Design of Unnatural Substrates for Expanded Ribosomal Synthesis of Sequence-Regulated Compounds

研究代表者

山東 信介 (SANDO SHINSUKE)

九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授

研究者番号：20346084

研究成果の概要 (和文)：

細胞が利用する翻訳システムは配列が制御された生体分子（蛋白質）を合成できる画期的な分子機械である。本課題では、この蛋白質翻訳システムを利用した人工分子合成に向け、使用できる基質の拡張に向けた有機化学的アプローチを実施した。その結果、基質拡張に向けた指針を得るとともに、非天然基質の効率的利用に向けた新しい手法の開発に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

The cellular translation system is a sophisticated molecular system that can polymerize substrates (amino acids) in a highly sequence-programmed manner to produce biomolecules (proteins). In this research, we challenged expansion of substrates that can be used for ribosomal-synthesis of a variety of artificial compounds, especially by chemical approach, and developed a new method for efficient use of such unnatural substrates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
総計	19,300,000	5,790,000	25,090,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：蛋白質・リボソーム・配列制御型合成

1. 研究開始当初の背景

リボソームは mRNA コードを読み取り、20 種類のアミノ酸を配列選択的につなげ合わせ、最終的にサイズ・配列・大きさの厳密に制御されたポリアミド、すなわち蛋白質を合成する精巧な巨大分子である。精密な有機合成分子としてみた場合、mRNA の配列に従ってアミノ酸を重合する仕組みは非常に優れたものである。化学的アミノアシル化法に基づく amber suppression 法・4 塩基コドン法の開発により、リボソームを介し多様なアミノ酸誘導体が部位特異的に蛋白質に導入可能であることが示されてきた。

この優れた蛋白質翻訳システムを改変し、人工分子の合成に応用しようという試みが注目を集めている。本来、3 塩基の組み合わせ（コドン）に 20 種類の天然アミノ酸が割り当てられているが、それぞれのコドンに非天然型・人工基質を割り当てることができれば、mRNA の配列にしたがって様々な多様性指向型分子を合成することが可能である。特にリボソームを介した selection 手法である ribosome-display や mRNA-display と組み合わせることにより、非天然分子ライブラリーからの活性分子の進化的選択も可能になると考えられる。自己増幅・ライブラリーの多様性を考えると、現在のコンビナトリアルケミストリーを中心とした有機化合物探索システムに比べ、圧倒的な効率を有しており、大きい期待が持たれている (review, see for example: Cornish VW. et al. *Methods* 2005, 36,279-290)。有機化合物に自己進化・選択という概念を組み込もうとするものであり、化学的にも非常に興味深い。

“蛋白質翻訳システムの有機合成”に向け世界中でも様々な翻訳システム改変に関する研究が実施されており、我々も有機小分子を用いたアプローチを展開している (Sando S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 7998)。このような目的に対し、有機化学的に最も興味深いのはリボソームが重合できる基質・結合の多様性、すなわち、“リボソームを用いて複雑な人工分子を合成するための手法論・合理的な基質の設計指針”である。様々な角度から問題点、ブレイクスルーの必要性に対する検討を行い、本研究課題を提案した。

2. 研究の目的

本研究では「リボソームによるペプチド転移反応機構の理解と応用」を学術的課題とし、究極的には「リボソームを用いた配列制御型有機合成系の拡張」が長期目標である。しかし、本課題期間内においては、短期目標として「有機化学的アプローチによる大腸菌蛋白質翻訳システム適合型基質の合理的設計指針」の確立に焦点を当て、特に天然型リボソームを用いた非天然分子合成能の拡張を目指した。

現状におけるリボソームを用いた有機分子合成の大きな問題点/改善点として次の2点：1.蛋白質翻訳システムを持つ主鎖伸張型基質に対する厳格性 2.非天然分子導入効率の低さ、に注目した。本点の改良により、現在抱えている多くの制限を解除することが可能であると考えられる。

具体的には下記2課題を設定し、研究を実施した。

目的(I)：リボソームに適応可能な主鎖伸張型基質の合理的設計指針の確立

再構成蛋白質翻訳系を用いた研究から、リボソームは天然型 α -アミノ酸の側鎖改変に対し寛容であるが、主鎖改変に対しては厳密であることが示唆されていた。すなわち、リボソームを用いて主鎖伸張型の人工分子を合成し、機能性分子を探索することは難しいと考えられていた。しかし、主鎖伸張型の基質は β -peptideに代表されるように非常に有用なコンポーネントであり、報告されている機能性分子・薬剤の中にも多く使われている基質である。申請者は一連の予備実験から、主鎖伸張型であっても求核基を制御することによって大腸菌翻訳システムに適応できることを発見している。この知見を元に、蛋白質翻訳システム基質適合機構の詳細な解析を行い、リボソームが重合可能な主鎖伸張型基質の包括的デザイン指針(strategy)を打ち出すことを目指した。

目的(II)：非天然基質の触媒的 tRNA アシル化系の構築

上記基質拡張に加え、リボソームを用いた配列制御型合成に向け、必要とされるブレイクスルーとして”非天然アミノ酸の効率的アミノアシル化法”が挙げられる。様々な非天然アミノ酸導入実験では主に化学的アミノアシル化法が用いられてきたが、本法の大きな問題点として、技術的に非常に難しいことに加え、aminoacyl-tRNA (aa-tRNA)がsingle turnover useであること、すなわち、導入率が落ちてしまうことが挙げられている。これは、触媒的にtRNAがアミノアシル化酵素(aa-RS)によってアミノアシル化される天然系と大きく異なる点である。Schultzらによって実現されたaa-RS-*in vivo* selection系によって、非天然アミノ酸の触媒的アミノアシル化が実現されている。本法は細胞内での部位特異的非天然アミノ酸導入を可能にする優れた手法であるが、その探索は非常に大変な作業であり、特に、細胞毒性・代謝活性の高い基質に対するaa-RS取得が困難である等、問題点も同時に有する。

そこで本課題に対し有機化学的アプローチを計画した。具体的には”化学的アミノアシル化 AMP 法 (Chemically misacylated AMP)”を実施した。aa-RS による tRNA のアミノアシル化は主に 2 段階のステップ i) アミノ酸(aa)の AMP 化, ii) aa-AMP の tRNA へのアミノアシル化反応 を経る。計画したアプローチは、第一段階である AMP 化を化学的に行った基質(Chemically misacylated AMP)を用い、その拡張を目指すものである。非天然型基質は RS によって認識されないものが多いが、化学的 AMP 化を行うことにより、様々な分子が RS の基質となると期待した。

3. 研究の方法 及び 4. 研究成果

目的(1): リボソームに適応可能な主鎖伸張型基質の合理的設計指針の確立

蛋白質翻訳システムによる非天然基質重合反応は単純な系ではなく、(1) リボソーム反応サイト(A サイト)への非天然基質の適合、(2) EF-Tu/非天然基質-tRNA 複合化に基づくリボソームへの運搬 に代表される多段階の過程を経て実現される。すなわち、蛋白質翻訳系によって使用可能な基質を拡張するためには、上記各ステップにおける基質適合性(もしくは拡張するための必要条件)を検討する必要がある。本実験で上記(1),(2)に着目した検討を実施した。

(1) リボソーム A サイト適合性の検討

蛋白質翻訳システムによる非天然基質導入を妨げる原因の一つとして、反応サイトであるリボソーム A サイトへの非天然基質

の適合性が挙げられる。まず本点を検証すべく、リボソーム A サイトにおける基質-tRNA 活性をミミックした蛋白質合成阻害剤である Puromycin aminonucleoside (PANS) 誘導体を用いた実験を行なった。PANS 誘導体による翻訳阻害は、アミノ酸相当部位のリボソーム A サイトにおける適合性(導入+反応機構適合性)が阻害能に影響していると考えられる。すなわち、主鎖伸長型基質で修飾した PANS 誘導体を用い、大腸菌蛋白質翻訳系における蛋白質合成阻害能を調べることで、主鎖伸長型基質のリボソーム A サイト適合性を調べる事が可能となる。そこで、固相法を用いて種々のβ-アミノ酸、β-ヒドロキシ酸を有する種々の PANS 誘導体を合成した。具体的には、より本来のアシル化 tRNA 状態に近づけるため、5 端に CC 配列を有する CCPANS 誘導体を基本骨格として利用した。下記に合成した CCPANS 誘導体の例を示す。

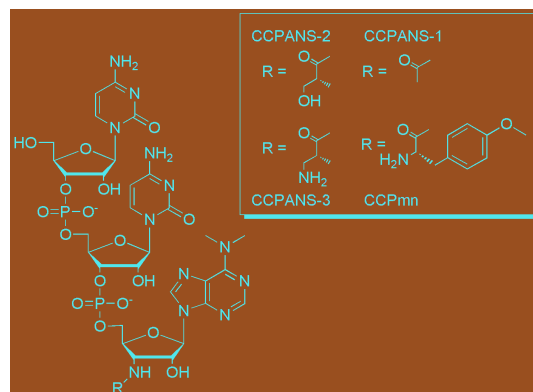


Figure 1. 合成した CCPANS 誘導体の例

上記にて合成した CCPANS 誘導体を用い、大腸菌再構築系蛋白質翻訳システムにおける蛋白質合成阻害能を調べた。具体的には、再構成蛋白質翻訳システムに firefly luciferase mRNA 溶液と CCPANS 誘導体水溶液を混合し、37 °C で incubation した後、この翻訳溶液希釈液に luciferase assay solution を加えて、発光強度を Wallac で測定した。mRNA は PCR によって DNA template を作成し転写することによって得た。また、翻訳効率は CCPANS 誘導体非存在下での luciferase 活性から得られる検量線を用いて算出した。

その結果、negative control である CCPANS-1 は、本実験条件下では阻害効果を示さず、positive control である CCPm は、非常に高い阻害活性を示した。基質にβ-ヒドロキシ酸を有する CCPANS-2 は CCPm よりは劣るものの阻害効果を示したことから、β-ヒドロキシ酸がリボソーム基質であることを支持する結果が得られた。興味深いことにβ-アミノ酸を有する CCPANS-3 も negative control である CCPm に比べて強い阻害効

果を示した。既に解析に必要な種々の CCPANS 誘導体の合成は完成しており、リボソーム内ペプチド転位反応が律速段階となる反応系を用いることで、より詳細なりボソーム A サイトでの基質選択性解析も可能となる。

以上の結果、やはり β -ヒドロキシ酸がリボソーム A サイトの基質になり得ることが示された。一方、単純に考えれば、 β -アミノ酸もリボソーム A-site に対する適合性を有しており、リボソームの基質に為り得ることが示唆された。様々なステップの最適化により、 β -アミノ酸の利用も視野に入る結果を得た。

(2) EF-Tu/非天然基質-tRNA 複合化に基づくリボソームへの運搬 (岡山大学宍戸研大槻先生との共同研究)

上記ではリボソーム内 A-サイトでの基質適合性に焦点をあて、阻害剤合成、アッセイ、評価を行った。

一方、基質が付加された tRNA は、EF-Tu との複合体形成過程を経てリボソーム内に運搬される。すなわち、主鎖伸長型基質を有する tRNA と EF-Tu の相互作用が、主鎖伸長型基質の導入効率に関与している可能性が考えられる。そこで、化学的アミノアシル化により主鎖伸長型基質を有するアミノアシル tRNA を合成、Native Page による相互作用解析実験から、主鎖伸長型基質の導入に関与している EF-Tu の効果について検討した。

その結果、 β -ヒドロキシ酸を有する tRNA は EF-Tu と複合体形成し、 β -アミノ酸の場合は、非常に弱いという結果を得た。

この結果により、EF-Tu との複合体形成過程に主鎖伸長型基質の構造が大きく関与すること、また、条件を最適化することによってリボソームによる β -アミノ酸の導入効率の向上が可能であるという非常に興味深い結果が示唆された。

目的(II):非天然基質の触媒的 tRNA アシル化系の構築

2. 「研究目的」項に記載した化学的アミノアシル化 AMP 法の確立に向け、まずフェニルアラニン(Phe)を基質とし、その AMP 体の合成を行なった。しかし、活性化基質である Phe-AMP は非常に加水分解されやすく単離・精製/保存が困難であった。そこで様々な検討を行なった結果、末端アミノ基を o-nitroveratryloxycarbonyl (NVOC) 基で保護することで安定化できることを見出した。NVOC 基は容易に光脱保護できることが知られており、実際、光照射で効率よく目的物

aa-AMP を生成できることが確認された。すなわち、あらかじめ保護した安定な NVOC-aa-AMP を基質に用い、反応前に光脱保護で活性 aa-AMP 体を放出する系が構築できた。

続いて、NVOC 基を光脱保護した Phe-AMP 体を基質とし、フェニルアラニル tRNA 合成酵素 (PheRS) による tRNA^{Phe} のアミノアシル化反応を行い、Acid PAGE を用いた解析を行った。その結果、アミノアシル化を示すバンドが確認され、天然型 aaRS は化学的 AMP 体も基質として認識し、対応する tRNA をアミノアシル化可能であることを見出した。

続いて、ペプチダーゼ耐性を有するなど有用な非天然基質である N-メチル化アミノ酸 (N-Me-Phe) を用いたアミノアシル化実験を行った。通常 RS を用いた tRNA アシル化反応条件 (N-Me-Phe + ATP) では、ほとんどアシル化反応が進行しなかったのに対し、N-Me-Phe-AMP 体を用いた場合、tRNA のアシル化を示す明確なバンドが確認された。非常に興味深いことに、Phe を用いた天然型アミノアシル化反応を上回る反応速度で非天然基質アシル化反応が進行した (N-Me 基質のアシル化/導入は生成ペプチドの質量測定により確認)。以上の結果、N-Me 体基質も AMP 体にすることで天然型 aaRS の拡張基質として機能することが見出された。また、複数の N-Me アミノ酸-AMP を用いた競合的アシル化反応から、aaRS は基質選択性を有しており、配列制御型 N-Me-ペプチド合成への応用も可能であることが示唆された。加えて、より効率的な光脱保護を目指し、光脱離活性の高い Bhc 基を用いた同様のアプローチも展開した。

光脱保護に基づく化学的アミノアシル化 AMP 法を開発し、本法により天然型 aaRS の基質拡張に成功した。本結果は、さらなる基質拡張への可能性を示すとともに、細胞を利用した配列制御型人工分子合成系への展開も期待できるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(研究代表者には下線)

- (1) Sando Shinsuke, Masu Hiroki, Furutani Chika, Aoyama Yasuhiro
“Enzymatic N-methylaminoacylation of tRNA using chemically misacylated AMP as a substrate.”
Org. Biomol. Chem. 2008, 6, 2666-2668.

- (2) Mizusawa Keigo, Abe Kenji, Shinsuke Sando, Yasuhiro Aoyama
“Synthesis of puromycin derivatives with backbone-elongated substrates and associated translation inhibitory activities.”
Bioorg. Med. Chem. 2009, 17, 2381-2387.

〔学会発表〕（計 12 件）

（研究代表者には下線、発表者には○）

口頭発表

- (1) ○山東信介、益啓貴、青山安宏
“翻訳システムを用いた非天然型高分子合成に向けた化学的アプローチ：Chemically Misacylated AMP 法による非天然型基質の触媒的 tRNA ミスアシル化”
第 2 回 無細胞生命科学研究会（2007, 東京大学）
- (2) ○山東信介、益啓貴、青山安宏
“リボソームを用いた非天然型高分子合成に向けたアプローチ：化学的ミスアシ

ル化 AMP 法に基づく非天然基質の触媒的 tRNA 付加反応と翻訳系への展開”
日本化学会第 88 春季年会(2008, 立教大学)
本発表に対し、日本化学会第 88 春季年会 優秀講演賞 (学術) を受賞

- (3) ○山東信介
日本化学会進歩賞受賞講演：“生体分析を目指した機能性核酸システムの創製”
日本化学会第 89 春季年会（2009, 日本大学）

など

〔その他〕

ホームページ等

http://www.inamori-frontier.kyushu-u.ac.jp/soft_material/

6. 研究組織

(1)研究代表者

山東 信介 (SANDO SHINSUKE)
九州大学・稲盛フロンティア研究センター・教授
研究者番号：20346084