

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月12日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750145

研究課題名（和文）

二重遺伝暗号と分割遺伝暗号を用いた人工翻訳システムの創成

研究課題名（英文）

Artificial translation system using dual sense codon and divided codon boxes

研究代表者

後藤 佑樹（GOTO YUKI）

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70570604

研究成果の概要（和文）：本研究は新機軸の人工遺伝暗号を用いた翻訳合成系の創成を目的として行った。具体的には、開始反応専用の遺伝暗号表を人工的に作成し、開始反応に利用できる改変開始残基のバリエーションを増やす「二重遺伝暗号」と、普遍遺伝暗号表のコドンボックスを分割し天然アミノ酸と非天然アミノ酸とを共存させる「分割遺伝暗号」という二つの新規概念を考案し、これらの実験的実証を行った。さらに、これら二つの手法を組み合わせることで、翻訳に利用できるビルディングブロックの種類を飛躍的に高めた(28種類以上)人工翻訳合成系を創り出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have designed two novel strategies in genetic code reprogramming, “dual genetic code” and “artificial division of codon boxes”, enabling us to create extremely engineered translation system. Dual genetic code is a translation-decoding system governed by two distinct reprogrammed genetic codes. One is the genetic code used for elongation reaction as usual, and the other is one exclusively used in initiation step. That is, a single codon has “dual sense” designating two distinct amino acids in initiation and elongation steps. In the approach of artificial division of codon boxes, a codon box occupied by one amino acid in natural is virtually split and two distinct amino acids are reassigned into each part of the divided codon box. This enables us to designate a codon box for an original proteinogenic and another desirable non-proteinogenic amino acids. We have experimentally demonstrated these two methodologies. Moreover, integration of these two novel strategies was also carried out, allowing us to drastically reprogram the decoding rule of translation system involving a wide array of non-standard and proteinogenic building blocks (totally over 28 species).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：遺伝暗号のリプログラミング・翻訳合成・ペプチド・ペプチドライブラリー・リボザイム・非天然アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

翻訳におけるコドン-アミノ酸の対応関係は普遍遺伝暗号として知られる。この対応関係を人工的に変えてやれば、天然 20 アミノ酸以外の非天然アミノ酸を基質とした翻訳系を構築可能だが、既存の遺伝暗号の改変法ではいくつかの天然アミノ酸を除去するため、利用可能な天然アミノ酸の種類が犠牲になってしまうという問題が存在した。

## 2. 研究の目的

非天然残基を翻訳系に組み込むための遺伝暗号改変戦略の究極形を提案し、大胆に遺伝暗号を改変した遺伝暗号システムを創る。これにより、上記制限を解決し、バリエーションに富んだアミノ酸を利用可能な翻訳合成系を確立する。

## 3. 研究の方法

本研究では、20 種類の天然アミノ酸全種類に加え複数の改変開始残基及び複数の非天然アミノ酸を同時に利用可能な、新機軸の翻訳システムの創成を目指す。まず、我々が新たに提唱する (I) 二重遺伝暗号表と (II) 分割遺伝暗号表の概念を実験的に実証することを目指した。その後、これら二つの概念を組み合わせることで、翻訳に利用できるビルディングブロックの種類を飛躍的に高めた(28 種類以上)人工翻訳合成系の作成を行った。

## 4. 研究成果

### (I) 二重遺伝暗号表の実証

① AUG 以外のコドンでも開始コドンとして機能できるのか(人工開始コドン)? ② 1 つのコドン配列は開始反応と伸長反応で構造の全く異なるアミノ酸を指定可能か(Dual sense codon)? ③ 複数の人工開始コドンが同一溶液内でお互いにミスリードせずに機能するか(人工開始コドンの直交性)? これら三つが可能であれば、開始と伸長でそれぞれ別の遺伝暗号表を参照するシステムを確立したことになる。

実際に、様々なアンチコドン配列を持つ開始 tRNA を適当な人工開始残基でアシル化し、この tRNA がそのアンチコドンに対応する人工開始コドンを持つ mRNA の翻訳を開始できることを確認し、①を実証した。さらに、適当な非天然アミノ酸でアシル化した伸長用の tRNA 存在下で、対応するコドン配列を人工開始コドンと伸長コドンの位置に持つ mRNA の発現を確認することで、②が可能であることを確認した。③の確認には、異なる Dual sense codon を持つ、二つ以上の mRNA の共発現を行い、目的の翻訳産物(二種類以上のペプチドの混合物)のみが生成していることを質量分析により実証した。

### (II) 分割遺伝暗号表の実証

分割遺伝暗号の実証には、④ T7 RNA ポリメラーゼで転写合成された(修飾塩基をもたない) tRNA が翻訳系に利用され翻訳産物を産生できるか? ⑤ tRNA<sup>EnAsn</sup> で、分割されたコドンボックスの片方だけに非天然アミノ酸を定義することが出来るか? ⑥ 分割コドンボックス中のコドンを複数同時に利用することが可能か? といった三つの確認実験が必要となる。様々な mRNA 配列を、天然の tRNA 混合物、あるいは各コドンに対応する 20 種類の T7 転写 tRNA の存在下で翻訳し、全てのアミノ酸について T7 転写 tRNA を用いても翻訳合成が可能であることを確認した(④)。次に、Aly-tRNA<sup>EnAsn</sup>(上段コドンに非天然アミノ酸を割り当て)と、下段に対応する天然アミノ酸用の T7 転写 tRNA とを加えた条件下、同一ボックスの上段コドンと下段コドンの一つずつ含むモデル mRNA 配列が正しく翻訳されたことから、⑤が可能であることを示した。同様に、複数の複数の分割コドンボックスを含む mRNA 配列の発現にも成功し、⑥の確認にも成功した。

### (III) 二重遺伝暗号及び分割遺伝暗号を組み合わせた新規翻訳合成系の確立

(I) と (II) において成功したコドンを選択した上で、分割コドン中に存在する Dual sense codon を持つ複数の mRNA の共発現実験を T7 転写 tRNA を用いて行った。その結果、予想されるペプチド産物のみが正しく産生していることが質量分析により確認されたため、当該コンセプトを利用した新規翻訳合成系の実証ができた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

①Iwasaki, K.; Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, H. Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有、2012, in press.

②Yamagishi, Y.; Shoji, I.; Miyagawa, S.; Kawakami, T.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library, *Chem. Biol.*, 査読有、2011, 12, 1183-1187..

③Katoh, T.; Goto, Y.; Reza, M.S.; Suga, H.

Ribosomal synthesis of backbone macrocyclic peptides, *Chem. Commun.*, 査読有、2011, 47, 9946-9958.

④ Goto, Y.; Katoh, T.; Suga, H. Flexizymes for genetic code reprogramming, *Nat. Protoc.*, 査読有、2011, 6, 779-790.

⑤ Ohshiro, Y.; Nakajima, E.; Goto, Y.; Fuse, S.; Takahashi, T.; Doi, T.; Suga, H. Ribosomal Synthesis of Backbone-Macrocyclic Peptides Containing  $\gamma$ -Amino Acids, *ChemBioChem*, 査読有、2011, 12, 1183-1187.

⑥ Goto, Y.; Ito, R.; Suga, H. A new drug discovery strategy powered by RaPID system, *MEDCHEM NEWS*, 査読無、2010, 20, 26-31.

⑦ Shimomai, D.; Goto, Y.; Suga, H. A platform technology for the discovery of novel peptide drug leads, RaPID system, *Kagaku Kougyo*, 査読無、2011, 62, 109-115.

⑧ Ito, R.; Goto, Y.; Suga, H. Discovery of isoform-specific cyclophilin binders powered by the RaPID system, *Peptide Science*, 査読有、2010, 47th, 244.

⑨ Ohshiro, Y.; Nakajima, E.; Goto, Y.; Kawakami, T.; Ohta, A.; Suga, H. Ribosomal synthesis of cyclic peptides containing various  $\gamma$ -amino acids, *Peptide Science*, 査読有、2010, 47th, 212.

⑩ New strategies for genetic code reprogramming; dual genetic code and artificial division of codon boxes, *Peptide Science*, 査読有、2010, 47th, 62.

⑪ Goto, Y.; Okesli, A.; van der Donk, W. A. Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family, *Biochemistry*, 査読有、2011, 50, 891-898.

⑫ Hayashi, G.; Goto, Y.; Suga, H. Ribosome evolution for two artificial amino acids in *E. coli*, *Chem. Biol.*, 査読有、2010, 17, 320-321.

⑬ Goto, Y.; Li, B.; Claesen, J.; Shi, Y.; Bibb, M. J.; van der Donk, W. A. Discovery of unique lanthionine synthetases reveals mechanistic and evolutionary insights, *PLoS Biol.*, 査読有、2010, 8, e1000339.

[学会発表] (計 17 件)

① 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、日本化学会第 92 春季年会、PatD:アゾリン骨格含有分子の高汎用性合成ツール、2012 年 3 月 27 日、横浜

② 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、日本化学会第 92 春季年会、翻訳後環化酵素:アゾリン骨格含有分子の高汎用性合成ツール、2012 年 3 月 27 日、横浜

③ 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、第 14 回 生命化学研究会、パテラミド合成酵素は幅広いペプチド配列にアゾリン骨格を導入する、2011 年 12 月 2 日、白浜

④ 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、9th Australian Peptide Conference、A posttranslational heterocyclase: a versatile synthetic tool for various azoline-containing compounds、2011 年 11 月 19 日、Hamilton Is., Australia

⑤ 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、11th Tateshina Conference on Organic Chemistry、PatD: a versatile synthetic tool for various azoline-containing compounds、2011 年 11 月 12 日、蓼科

⑥ 後藤佑樹、BioJapan2011、無細胞翻訳系と翻訳後修飾酵素を利用した特殊骨格含有ペプチドライブラリーの迅速構築、2011 年 10 月 5 日、横浜

⑦ 後藤佑樹・伊藤悠美・菅裕明、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、パテラミド合成酵素:アゾリン骨格含有化合物の高汎用性合成ツール 2011 年 9 月 14 日、つくば

⑧ 後藤佑樹、新世代の生物有機化学研究会 2011、ヘテロ環化修飾酵素を用いた化合物ライブラリー構築、2011 年 7 月 9 日、京都

⑨ 後藤佑樹・伊藤悠美・人見梓・村上裕・菅裕明、第 13 回生命化学研究会シンポジウム、二重遺伝暗号を用いて翻訳合成系をリプログラミングする、2011 年 1 月 7 日、仙台

⑩ Yuki Goto, Bo Li, Yanxiang Shi, Ayse Okesli, Wilfred A. van der Donk, Pacificchem 2010、Discovery and characterization of unique lanthionine synthetases reveals mechanistic and evolutionary insights、2010 年 12 月 17 日、Waikiki, USA

⑪ 後藤佑樹・人見梓・村上裕・菅裕明、5<sup>th</sup> International Peptide Symposium、New strategies for genetic code reprogramming; dual genetic code and artificial division of codon boxes、2010 年 12 月 4 日、京都

⑫ 大城幸紀・中島永二・後藤佑樹・川上隆史・太田淳・菅裕明、5<sup>th</sup> International Peptide Symposium、Ribosomal synthesis of cyclic peptides containing various  $\gamma$ -amino acids、2010 年 12 月 7 日、京都

⑬ 伊東利紗・後藤佑樹・菅裕明、5<sup>th</sup> International Peptide Symposium、Discovery of isoform-specific cyclophilin binders powered by the RaPID system、2010 年 12 月 8 日、京都

⑭ 後藤佑樹、理研若手研究会・新規材料創成

を目指した合成生物学、二重遺伝暗号を用いた翻訳合成系のリプログラミング、2010年11月19日、和光

⑮後藤佑樹、7th Japanese-German Frontiers of Science Symposium、New artificial translation system; dual genetic code and artificial division of codon boxes、2010年11月13日、Potsdam, Germany

⑯後藤佑樹、International Symposium on Nano-bio Molecular Assembly、Reprogramming genetic code and its application for drug discovery、2010年6月15日、Seoul, South Korea

⑰後藤佑樹・菅裕明、日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会、短鎖ペプチドイニシエーターを用いた特殊ペプチドの翻訳合成、2010年5月18日、横浜

[図書] (計2件)

①伊藤悠美・後藤佑樹・菅裕明、最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用、メディカル ドゥ、2012年、125-130

②後藤佑樹・菅裕明、核酸化学のニュートレンド、化学同人、2011年、32-35

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：アズリン化合物及びアゾール化合物のライブラリー、並びにその製造方法

発明者：菅裕明・後藤佑樹・伊藤悠美

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/056181

出願年月日：2011年3月9日

国内外の別：国内及び外国 (PCT)

名称：新規人工翻訳合成系

発明者：菅裕明・村上裕・後藤佑樹

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/069251

出願年月日：2010年8月27日

国内外の別：国内及び外国 (PCT)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/bioorg/kenkyu/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 佑樹 (GOTO YUKI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：70570604

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし