

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006~2008

課題番号：18350084

研究課題名（和文） 遺伝コードの進化・拡張と配列制御鋳型重合への応用

研究課題名（英文） EVOLUTION/EXPANSION OF GENETIC CODES AND ITS APPLICATION TO PRECISION SEQUENCE CONTROL IN TEMPLATED POLYMERIZATION

研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00038093

研究成果の概要：

非天然基質のタンパク質への導入に関し、リボソームを利用した主鎖伸張型（高）分子合成について検討し、タンパク質のリボソーム合成において適用できる非天然基質として β -ヒドロキシ酸が有効な基質になりえることを明らかにした。また、基質についての選択性が EF-Tu との相互作用の強さにあることを解明した。非天然基質のタンパク質への導入手法については化学的ミスアシル化 AMP 法を開発し、非天然タンパク質の酵素合成に道を拓いた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
19年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
20年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	1,9760,000

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：翻訳系・タンパク質生合成・tRNA・アシル tRNA 合成酵素・アシル化 AMP・リボソーム・EF-Tu・化学的ミスアシル化 AMP

1. 研究開始当初の背景

(1) リボソームを中核と拘る生体の蛋白質翻訳システムは非常に複雑で、なかなか分子・原子レベルでの理解や設計が容易ではないが、“有機化学に基づく論理的設計”が様々な視点から検討されてきた。リボソーム利用した非天然人工分子合成が実現されれば、様々な Display テクノロジーと組み合わせ、非天然基質よりなるリガンド・機能性高分子の進化的探索が可能になると期待される。

(2) リボソームを用いた人工分子のコンビ

ナトリアル合成と進化的手法を融合させた機能性分子探索に向け、リボソームによって重合可能な非天然基質の多様性が大きな焦点となっている。様々な研究により、現在までに数多くの非天然 α -アミノ酸がリボソームを介して重合可能であることが確認されてきた。しかし、近年の報告では、リボソームは側鎖及び求核基における多様性に対しては非常に寛容であるのに対し、主鎖改変に関しては厳密であることが示唆されている。例えば、 β 位にアミノ基を有する β -アミノ酸は

大腸菌リボソームにとって好ましい基質ではない（仮に導入できたとしても非常に効率が悪い）と考えられている[。しかし、主鎖長の異なる基質は、β-ペプチドに代表されるようにその特徴的な構造と誘起される物性の多様性から非常に興味深い化合物である。

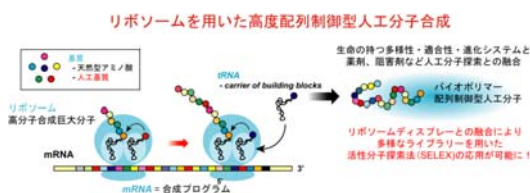
(3) リボソームを用いた配列制御型合成に向け、非天然基質の tRNA アシル化反応は越えるべき大きな関門の一つである。化学的ミスアシル化法 や、リボザイム法、チオエステル-PNA 法など、優れた非天然基質アシル化法が報告されている。一方、生命が利用する tRNA 合成酵素 (aaRS) を用いたアミノアシル化反応は触媒性に起因する効率、生体応用性など様々な側面において優れた機能を有しており、この aaRS を用いた非天然アシル化に注目が集まりつつある。例えば、天然系は 100 個以上のアミノ酸を重合できるのに対し、化学的アミノアシル化法で作成した場合、10 個程度繋げるのが限界である。幾つかの要因があると思われるが、その一つとして化学的手法で作成された aa-tRNA は 1 回限りの使用であるのに対し、酵素的には触媒的にアミノ酸をチャージできる点があると考えている。) 我々は、aaRS に許容される非天然基質拡張に向けた合理的設計を実施した。目標としては、“なんとかアシル化できる” というものではなく、非天然高分子合成に向け、天然系に比する速度/触媒活性で非天然基質を tRNA にチャージしうる方法の開発が強く望まれてきた。

2. 研究の目的

本基盤研究の目的は上記の 2 つの課題、すなわち、「リボソームを利用した主鎖伸張型（高）分子合成」、2. 「化学的ミスアシル化 AMP 法に基づく非天然基質の酵素的アシル化—非天然型重合に向けて—」に関し基本的な問題点を解決し、広範囲の非天然基質をタンパク質に効率よく導入するための新方法論を開拓し、これを配列が高度に制御された鑄型重合に応用することである。

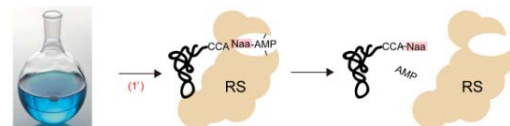
3. 研究の方法

(1) 「リボソームを利用した主鎖伸張型（高）分子合成」に関しては基質としてβ-ヒドロキシオプロピオン酸を検討した。これは、β-ア



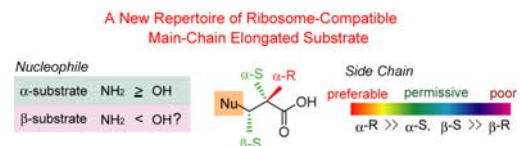
ミノ酸のアミノ基を水酸基に置き換えたものであるが、アミノ基を異なり水酸基はプロトンされず、従って求核性を維持できると考えたからである。

(2) 「化学的ミスアシル化 AMP 法に基づく非天然基質の酵素的アシル化—非天然型重合に向けて—」に関しては、アミノアシル化反応での基質選択性を生み出す要因に対する仮説から、化学的に合成した活性化 AMP 体 (aa-AMP) を基質として用いることを計画した。しかし、活性化体である aa-AMP は（当然のことであるが）非常に加水分解されやすく単離/保存が困難であった。そこで様々な検討を行ない、末端アミノ基を NVOC 基で保護することで非常に安定に保持できることを見出した。NVOC 基は光照射で容易に脱保護でき、効率よく aa-AMP を生成することが可能であると考えた。



4. 研究成果

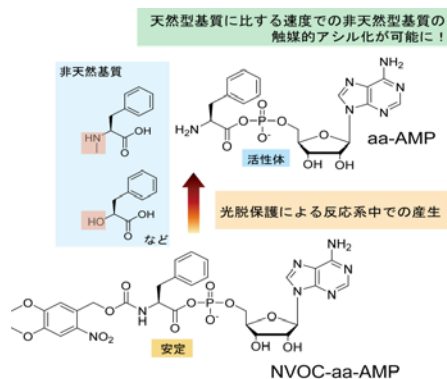
(1) 主鎖伸長型基質β-ヒドロキシプロピオン酸 (β-HPA) がより求核性の高いβ-アミノ酸よりも好ましい基質であり、実際、リボソームを介したオリゴペプチド/蛋白質への部位特異的導入が可能であることを実証した (pKa-based approach)。また、α・β炭素に置換基を持つ一連のβ-HPA 誘導体 (α-R, α-S, β-R, β-S) の導入効率比較から、β体においても様々な側鎖修飾が可能であり、特定の位置 (α-R) への側鎖導入が導入効率を上昇させるという知見も得た。



これは非常に面白い結果であるが、このペプチド転移反応に基づく基質設計はあくまで仮説である。そこで、更なる基質拡張・効率の改善を目指し、主鎖伸長型基質導入を決

定する要因に関する詳細な検討を行った。主鎖伸長型基質に変換したピューロマイシン誘導体を用い、大腸菌翻訳系における蛋白質合成阻害能を調べることで、基質のペプチド転移反応適合性を推測することが可能となる。そこで、 β -アミノ酸、 β -ヒドロキシ酸を持つ種々のピューロマイシン誘導体を合成、それぞれの基質の適合性を検討した。驚いたことに、当初の仮説に反し β -アミノ酸もリボソームの基質となり得ることが示された。つまり、 pK_a の差によって基質に成りやすさが変わるという“ pK_a -based approach”は正しいが、 β -アミノ酸が蛋白質翻訳システムの基質と成り得ない理由はリボソームペプチド転移反応に対する非適合性が主要因ではなく、別のファクターが存在するというのである。これは、よく考えてみると幸運で、もしリボソームへの適合性が主要因であればリボソーム自身を改良しないといけないということになってしまい、これは、恐ろしく困難である。一方、 pK_a 相違による基質選択性を生み出す要因が別に存在すれば、そこを改善してやれば翻訳システムを利用した β -ペプチド合成も可能ということになる。また、 β -HPAが導入可能であることから立体障害などは大きな要因でないことも予想され、翻訳条件をうまく検討してやれば β -アミノ酸の導入も可能性があるように思われる。実際、岡山大学宍戸研大槻先生との共同研究の結果、aa-tRNAをリボソームに運ぶElongation factor Tu (EF-Tu)との複合体形成過程が pK_a の異なる主鎖伸長型基質の導入に大きく関与するという非常に興味深い実験結果も得られた。今後、EF-TuやtRNAの改変によって、複雑な翻訳システムを用いた β -ペプチド合成も可能になると期待している。

(2) まず、NVOC基を光脱保護したPhe-AMP体を基質とし、PheRSによるtRNA^{Phe}のアミ



ノアシル化反応を行った。その結果、天然型aaRSはaa-AMP体も活性型基質として直接利

用可能であることを見出した。続いて有用な非天然基質であるN-メチル化基質(N-Me-Phe)を用いたアミノアシル化実験を実施した。通常のアシル化条件(N-Me-Phe + ATP)では、ほとんどアミノアシル化が進行しなかったのに対し、N-Me-Phe-AMP体を基質として用いた場合、非常に興味深いことに天然型アミノアシル化反応とほぼ同等の反応速度でN-メチルアミノアシル化反応が進行した。更に、翻訳ペプチドのMASSを測定することで、確かに活性型N-Me-Phe-tRNAが生成されていることが実証できた[15]。また、複数の基質を用いた競合的N-メチルアミノアシル化実験から、aaRSは活性化アミノ酸間の基質選択性を有しており、配列制御型N-Me-ペプチド/蛋白質合成への応用も可能であることが示された。本系を用いることで、N-Me-アミノ酸によるtRNAの酵素的アシル化が可能であることが実証され、また、アシル化速度は天然基質に対するアミノアシル化反応に比して遜色ないものであった。例えば、翻訳溶液中に安定なNVOC-aa-AMP体として含有させ、光照射によって不安定な活性aa-AMP体を徐々に発生させるという系の構築も理論上可能である。本結果は、さらなる基質拡張への可能性を示すとともに、配列制御型人工高分子合成系への展開も期待できる。

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7件)

- ① K. zusawa, K. Abe, S. Sando, Y. Aoyama, "Synthesis of Puromycin Derivatives with backbone-Elongated Substrates and Associated Translation Inhibitory Activities", *Bioorg. Med. Chem.* in press. 査読有
- ② Y. Aoyama, "Structure and Function of Molecular Assembly. A Personal Reminiscence", *Bull. CHem. Soc. Jpn.*, 82, 419-438 (2009). 査読有
- ③ S. Sando, H. Masu, C. Furutani, Y. Aoyama, "Enzymatic N-methylaminoacylation of tRNA Using Chemically Misacylated AMP As a Substrate", *Org. Biomol. Chem.*, 6, 2666-2668 (2008). 査読有
- ④ S. Sando, K. Abe, N. Sato, T. Shibata, K. Mizusawa, Y. Aoyama, "Unexpected Preference of the E. coli Translation System for Ester-Bond During Incorporation of Backbone-Elongated Substrates", *J. Am.*

- Chem. Soc.*, 129, 6180-6186 (2007). 査読有
- ⑤ S. Sando, A. Ogawa, T. Nishi, M. Hayami, Y. Aoyama, “In Vitro Selection of RNA Aptamer Against Escherichia Coli Release Factor 1”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 1216-1220 (2007). 査読有
- ⑥ S. Sando, A. Ogawa, T. Nishi, M. Hayami, Y. Aoyama, “In Vitro Selection of RNA Aptamers against Escherichia coli Release Factor 1”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 1216-1220 (2006). 査読有
- ⑦ A. Ogawa, S. Sando, Y. Aoyama, “Termination-Free Prokaryotic Protein Translation Using Abticon-Adjusted E. Coli tRNA^{Ser} as Unified Suppressor of the UAA/UGA/UAG Stop Codons. Read-Through Ribosome-Display of Full-Length DHFR with Translated UTR as a Buried Spacer Arm” *ChemBioChem*, 7, 249-252 (2006). 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 山東信介・益啓貴・青山安宏、“リボソームを利用した非天然型高分子合成に向けた化学的アプローチ：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 年 3 月 29 日、立教大学、船橋、千葉
- ② 山東信介・青山安宏、“化学的アプローチに基づく生体分子機能の拡張と非侵襲的解析ツールへの展開”、第 2 回無細胞生命科学研究会、2007 年 10 月 19 日、東京大学、東京
- ③ 山東信介・青山安宏、“化学的アプローチに基づく生体分子機能の拡張と非侵襲的解析ツールへの展開”、第 2 回無細胞生命科学研究会、2007 年 10 月 19 日、東京大学、東京
- ④ 益啓貴・山東信介・青山安宏、“非天然分子を基質とする触媒的 tRNA ミスアシル化に向けたアプローチ：化学的ミスアシル化 AMP 法の検討”、第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、2007 年 9 月 28 日、東北大学、仙台、宮城
- ⑤ Hiroki Masu, Masayoshi Hayami, Shinsuke Sando, and Yasuhiro Aoyama, “A new strategy for acylation of tRNA with unnatural substrates”, 134th ACS National Meeting, 2007 年 8 月 22 日, Boston, USA
- ⑥ Keigo Mizusawa, Shinsuke Sando, and Yasuhiro Aoyama, “Rational design of main-chain elongated substrates acceptable by the E.coli ribosome”, 134th ACS National Meeting, 2007 年 8 月 22 日, Boston (USA)
- ⑦ 水澤圭吾・阿部健二・山東信介・青山安宏、“大腸菌リボソームによって導入可能な非天然基質の拡張：主鎖伸長型基質の導入に関するファクター”、日本ケミカルバイオロジー研究会第 1 回年会、2007 年 5 月 9 日、京都大学、京都
- ⑧ 益啓貴・速水将勝・小川敦司・西輝之・山東信介・青山安宏、“蛋白質翻訳システムの応用に向けた化学的アプローチ”、日本ケミカルバイオロジー研究会第 1 回年会、2007 年 5 月 9 日、京都大学、京都
- ⑨ 益啓貴・速水将勝・小川敦司・西輝之・山東信介・青山安宏、“蛋白質翻訳システムの応用に向けた化学的アプローチ”、日本化学会第 87 春季年会、2007 年 3 月 26 日、関西大学、吹田、大阪
- ⑩ 水澤圭吾・阿部健二・山東信介・青山安宏、“大腸菌リボソームによって導入可能な非天然基質の合理的拡張：主鎖伸長型基質の導入に関するファクター”、日本化学会第 87 春季年会、2007 年 3 月 25 日、関西大学、吹田、大阪
- ⑪ Kenji Abe, Nobuhiko Sato, Toshihiro Shibata, Keigo Mizusawa, Shinsuke Sando, Yasuhiro Aoyama, “Effort toward Ribosome-Catalyzed Synthesis of Structurally-Diverse Peptidomimetic Libraries: Expansion of Unnatural Substrates Acceptable by the E. coli Ribosome”, International Conference of Japanese Peptide Symposium/Peptide Engineering Meeting, 2006 年 11 月 5 日、横浜、神奈川

[その他]

ホームページ

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/aoyama-lab/>

本研究成果を含む業績により山東信介は平成 20 年度日本化学会進歩賞を受賞した。また、学会発表①および⑩はそれぞれの学会に置いてポスター賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 安宏 (AOYAMA YASUHIRO)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：00038093

(2) 研究分担者 (2006 年度のみ)

山東信介 (SANDO SHINSUKE)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：20346084