

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20681022

研究課題名(和文) ポリペプチド翻訳合成：D体アミノ酸とベータアミノ酸への新展開

研究課題名(英文) D-amino acids and beta-amino acids: a new frontier in Ribosomal synthesis of non-standard polypeptides

研究代表者 村上 裕 (MURAKAMI, HIROSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：10361669

研究成果の概要(和文)：

通常、D体アミノ酸やベータアミノ酸を含むペプチドは翻訳合成できないとされている。この通説を検証するために、本研究課題では様々な種類の側鎖を持つこれらアミノ酸と翻訳系の適合性を調べた。その結果、いくつかのD体アミノ酸とベータアミノ酸が翻訳系に受け入れられることが明らかになった。本成果は、特殊な主鎖構造を含むペプチドの翻訳合成への道を切り開き、特殊ペプチドの創薬への応用を促進すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

It is believed that the ribosomal translation machinery does not accept D-amino acids and beta-amino acids. In this study, we investigated the incorporation of these non-proteinogenic amino acids into peptides, and found that the translation machinery actually accepts several kinds of D-amino acids as well as beta-amino acids. These results open the way for the ribosomal synthesis of novel non-standard peptides with main-chain modified groups, and would facilitate the use of these unique building blocks in peptides for drug discovery.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生合成、翻訳合成、D体アミノ酸、ベータアミノ酸、非蛋白質性アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

翻訳反応は、20 種類の蛋白質性アミノ酸を構成因子としたポリペプチドを、mRNA を鋳型として正確に合成する反応である。近年、我々は RNA 触媒によるアミノアシル tRNA 合成法を用いて遺伝暗号を改変する技術を開発した。これにより様々な非蛋白質性アミノ酸が翻訳系で使用できるようになり、特殊ペプチドの翻訳合成が原理的に可能となった。さらに我々は、本方法とリボソーム提示法や mRNA 提示法 (*in vitro virus* 法) を組み合わせることで、特殊ペプチドのライブラリー化を行い、創薬への応用を試みている。

特殊ペプチドのライブラリー化には、翻訳系において使用可能な非蛋白質性アミノ酸の種類を知ることが必要である。特に D 体アミノ酸やベータアミノ酸は、生理活性を持つ多くの天然物に含まれていることから、これらのアミノ酸を含むペプチドの翻訳合成には期待が大きい。しかしながら、アミノ酸の翻訳系への適合性は、側鎖に特殊な構造を持つものについて詳細に調べられているものの、主鎖に特殊な構造を持つものについては報告例が少ない。特に D 体アミノ酸やベータアミノ酸については報告例が少ない上に、多くの試みが否定的な結果を示している (図 1)。

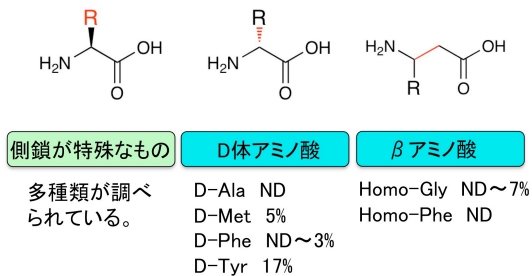


図1 これまでに報告されたアミノ酸の種類と導入効率 (効率は蛋白質性アミノ酸との比較により評価している)。ND は検出限界以下を表す。

2. 研究の目的

本研究では、D 体アミノ酸やベータアミノ酸の翻訳系への適合性を詳細に解析し、翻訳系に受容されるアミノ酸を新しく見出すことを目的とする。さらに、これらのアミノ酸を含む特殊ペプチドを、翻訳系を用いて自在に合成する方法の開発を目指す。

3. 研究の方法

申請者は、D 体アミノ酸やベータアミノ酸は翻訳系に受容されないとした過去の文献

に、問題を 3 点見いだした (図 2)。

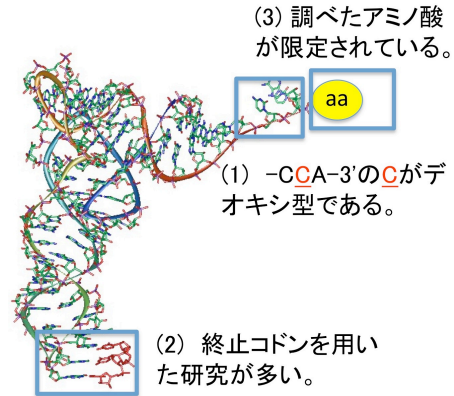


図2 これまでの研究の問題点。

第一はアシル tRNA の合成法である。過去の文献ではアシル tRNA 合成酵素の誤認識、もしくは人工的な半合成法を用いてアシル tRNA を合成している。申請者は、前者の方法ではアシル tRNA の合成効率が低いために、また後者の方法では、その合成法の都合上 tRNA の一部がデオキシ型となり、これが tRNA の活性を落としてしまうために、D 体アミノ酸やベータアミノ酸の導入に関して否定的な結果が得られたと考えた。

第二の問題点は、D 体アミノ酸やベータアミノ酸を指定するコドンである。過去の文献の多くは、これら非蛋白質性アミノ酸を指定するコドンとして UAG コドンを用いている。しかしながら UAG コドンは本来、翻訳の終結を指定するコドンであるため、センスコドンに比べアミノ酸導入効率が低い可能性がある。

第三の問題点は、調べられたアミノ酸の種類が少ないことである。これまで調べられたアミノ酸は、D 体のアミノ酸について D-Ala, D-Phe, D-Met, D-Tyr のみである。その他のアミノ酸については報告がない。さらに、上記の 4 種類のアミノ酸についても導入の可否は文献によって異なっており、結論が出ていない。また、ベータアミノ酸については homo-Gly と homo-Phe のみが調べられており、これも導入の可否は文献によって異なっている。

これらの問題点は、申請者が開発した RNA 触媒を利用した無細胞翻訳系を用いることで検証できると考えられる。第一の問題点を解決するために、RNA 触媒 (フレキシザイム) を用いてアミノアシル tRNA を調製した。

フレキシザイム法では、L 体アミノ酸・D 体アミノ酸・ベータアミノ酸などを効率よく tRNA に連結でき、生成物であるアミノアシル化 tRNA には半合成法の際のような一部がデオキシ型となる問題はない。こうして作成したアシル tRNA を無細胞翻訳系に加えて、ペプチドの合成を行った。翻訳系には MKKKX-Flag (X は D 体アミノ酸、もしくはベータアミノ酸) をコードする DNA を加え、転写翻訳共役系で反応を行った (図 3)。

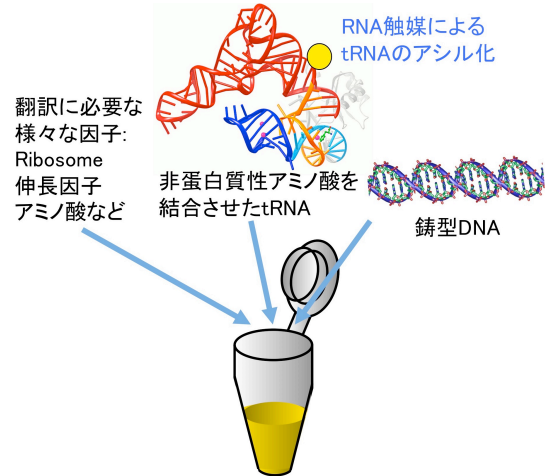


図 3 翻訳系の概要

第二の問題点を検証するために、X に対応するコドンとしては終止コドン、もしくは Ser に対応する UCC コドン (ただし Ser を翻訳系に加えていないので空コドンとなっている) を用いた。これにより、加えたアシル tRNA がこのコドンを読み、D 体アミノ酸やベータアミノ酸が導入されたときのみペプチドが合成される。そこで、電気泳動を行い Flag-Tag の部分に導入された ^{14}C -Asp の放射能よりペプチドをバンドとして定量した。さらに質量分析計を用いた解析よりペプチドを同定することで、それぞれのアミノ酸の導入の可否を検討した。

4. 研究成果

まず、第一と第二の問題点を検証するために、フレキシザイム法を用いて、L 体 Phe と D 体 Phe さらに homo-Gly と homo-Ala でアミノアシル化した tRNA を合成し、これらが無細胞翻訳系へ加えてペプチドを合成した。その結果、新たに D 体 Phe が翻訳系に受容されることがわかった (図 4 レーン 3, 8)。また、L 体 Phe と D 体 Phe を導入したペプチドは同じ分子量であるにも関わらず、電気泳動

の移動度に差があることから、D 体 Phe はラセミ化せずにペプチドへ導入されたことがわかった。半合成法を用いてアミノアシル tRNA を合成した過去の文献では、D 体 Phe のペプチドへの導入は非常に効率が悪く、これはフレキシザイム法により改善された点と考えられる。また、homo-Gly や homo-Ala については、UCC センスコドンに指定した場合にのみ、ペプチドへの効率的な導入が確認された (図 4 レーン 4, 5, 9, 10)。それぞれのペプチドは、質量分析により目的のものであることを確認した。本結果は、ベータアミノ酸のペプチドへの導入には指定コドン依存性があることを示唆している。

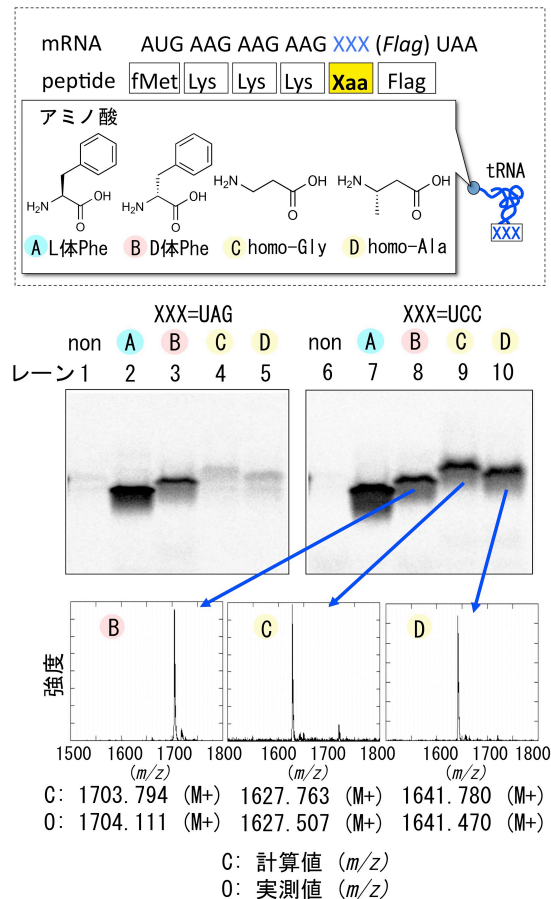


図 4 L-Phe, D-Phe, Homo-Gly, Homo-Phe を含むペプチドの翻訳合成。図下左は TAG を、右は TCC を XXX の位置にもつ DNA を使用した。ペプチドの分子量は MALDI-TOF-MS を用いて決定した。

次に、様々な側鎖を持った D 体アミノ酸について、ペプチドへの導入を試みた。まず、フレキシザイムを用いて UCC に対応するアンチコドン GGA をもつ tRNA に蛋白質性アミノ酸の光学異性体である 19 種類の D 体アミノ酸を結合させた。これを翻訳系に加え、翻訳

を行った結果、このうちの6種類のD体アミノ酸が効率よくペプチドに導入されることが分かった(図5 レーン 2, 6, 10, 12, 34, 36)。また、Tricine SDS-PAGE を用いて、D体アミノ酸とL体アミノ酸を導入したペプチドを比べると移動度に明らかな差があり、D体アミノ酸を導入したペプチドの分子量は計算値と一致していた。このことは、ペプチドへ導入されているアミノ酸がL体アミノ酸の混入物ではなく、D体アミノ酸であることを強く示している。また、過去の文献において、このようにD体アミノ酸の導入を直接的に確認した例はなく、D体アミノ酸を含むペプチドが翻訳合成可能であることを明確に示したはじめての例であると考えている。

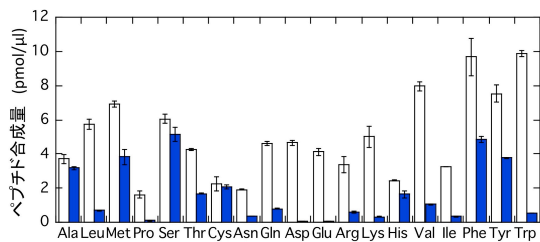
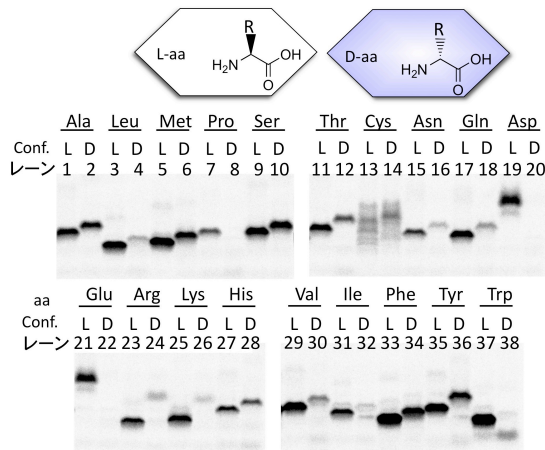


図5 様々なD体アミノ酸のペプチドへの導入。奇数のレーンはL体アミノ酸、偶数のレーンはD体アミノ酸を導入した。白色の棒はL体アミノ酸、青色の棒はD体アミノ酸を導入したペプチドの合成量を表す。

次に、側鎖の大きいアミノ酸として Phe, Tyr と、側鎖の小さいアミノ酸として Ala, Ser を選び、ペプチド合成量の時間依存性を調べた。その結果、側鎖の大きいアミノ酸についてはD体とL体で合成速度に大きな違いがあるのに対し、側鎖の小さいアミノ酸ではD体とL体の間に差がないことが分かった(図

6)。このことは、側鎖が大きいアミノ酸のが側鎖の小さいアミノ酸に比べて、立体異性体の影響が強いことを示している。

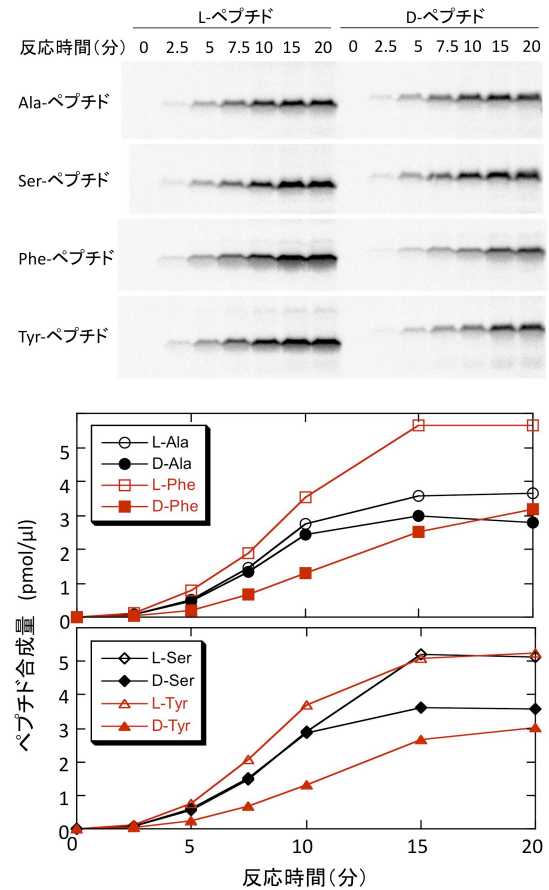


図6 ペプチド合成量の時間依存性。

次に、これらD体アミノ酸を複数個導入することを試みた。前年度に開発した方法を用い、mRNAの配列中に連続したD-Pheを指定するコドンを並べ、ペプチドの翻訳合成を試みた。しかしながら、ペプチドの合成量は検出限界以下であった(図7 レーン 10, 12)。

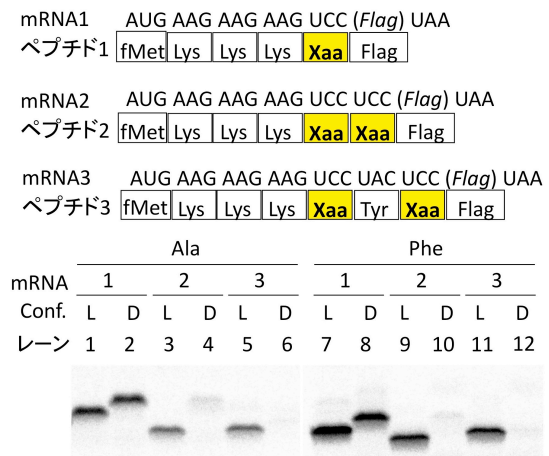


図7 複数のD体アミノ酸のペプチドへの導入。

我々は、(1)リボソーム P 部位の D-Phe がペプチドの伸長を阻害している、もしくは(2) D-Phe は側鎖が大きいと連続した導入には無理があると考えた。そこで、2 つの D-Phe 間に L-Tyr を挟んだものや、D-Phe の代わりにより側鎖の小さい D-Ala を用いたが、ペプチドの合成量は検出限界以下であった (図 7 レーン 4, 6, 10, 12)。本結果はリボソームに、複数の D 体アミノ酸の導入を排除する何らかの機構があることを示しており、これは将来解明すべき研究課題である。

本研究において、D 体アミノ酸やベータアミノ酸に関する新たな知見が得られた。これは、特殊ペプチドのライブラリー化のための基礎的で有用な知見である。本研究成果により、特殊ペプチドの創薬への利用が促進されると考えられる。

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 2 件)

査読有

Murakami, H., Ohta, A., Suga, H
Bases in the anticodon loop of tRNA(Ala)(GGC) prevent misreading.
Nat. Struct. Mol. Biol. **16** (2009) 353-358

査読無

村上裕・菅裕明

新創薬技術 RAPID システムとマイクロ・ナノデバイスへの期待
化学工業
59 (2008) 463-469

[学会発表] (計 9 件)

Hiroshi Murakami and Hiroaki Suga
"Ribosomal synthesis of non-natural peptides for drug discovery"
第 22 回内藤コンファレンス ケミカルバイオロジー [I]
2008 年 9 月 11 日
札幌、シャトレーゼ ガトーキングダム

村上裕

特殊ペプチドの翻訳合成—創薬を目指した新技術の開発—
2008 年度第二回東京大学工学部化学生命工学科談話会
2009 年 2 月 7 日
本郷、東京大学

村上裕

特殊ペプチドの翻訳合成
大阪大学蛋白質研究所セミナー
2008 年 9 月 25 日
吹田、大阪大学

村上裕

特殊ペプチドの翻訳合成—創薬を目指した新技術の創成
第 11 回生命化学研究会
2008 年 11 月 19 日
群馬県、水上館

Murakami, H., Ohta, A., Suga, H
Bases in the anticodon loop of tRNA^{Ala}_{GGC} evolved to avoid misreading
2nd Switzerland -Japan Biomolecular Chemistry Symposium
2009 年 9 月 11 日
東京、東京大学駒場 II

村上裕

翻訳系の研究と応用
細胞を創る 2009
2009 年 10 月 2 日
東京、東京大学本郷

村上 裕

フレキシブル無細胞翻訳系を用いた特殊ペプチドの創製
第 4 回バイオ関連化学シンポジウム
2010 年 9 月 24 日
大阪大学

村上 裕

進化学の創薬への応用
第 2 回バイオサイエンスリトリート
2010 年 11 月 27 日
長岡技術大学

Hiroshi Murakami, Yuki Goto, Hiroaki Suga
Flexible *in vitro* translation system for development of non-standard peptide inhibitors
Pacifichem2010
Dec. 18, 2010
Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 裕（東京大学 大学院総合文化研究
科 准教授）

研究者番号：
10361669

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：