

研究報告書

「鏡像タンパク質および鏡像核酸を合成するための分子技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 加藤 敬行

1. 研究のねらい

生体内において、ペプチドやタンパク質は基本的に全て L 体のアミノ酸のみから構成されており、核酸は D 体の糖から構成されている。一方で、これらの鏡像体である D 体ペプチドや D 体タンパク質・L 体核酸は、生体内のペプチダーゼやヌクレアーゼ(分解酵素)により分解されないため生体内安定性が非常に高く、新規ペプチド医薬や抗体医薬・核酸医薬の開発基盤として非常に有望である。しかし、D 体ペプチドや L 体核酸は化学合成によってしか合成できず、ペプチドの場合、ネイティブケミカルライゲーションのような特殊な手法を用いても 200 残基程度、核酸の場合も DNA で 200 塩基、RNA では 100 塩基程度という長さが限界である。さらに大きな問題として、化学合成では mRNA ディスプレイ法や SELEX 法といったペプチドや核酸の配列探索手法が利用できないため、そもそも創薬標的に結合しうる D 体ペプチドや L 体核酸の配列を取得することが困難である。そこで、本研究では D 体アミノ酸のペプチド鎖中への連続導入を可能にするリボソーム翻訳系を開発し、さらにこれを用いて D 体の DNA ポリメラーゼを翻訳合成することにより L 体ヌクレオシドから成る核酸の合成を実現することを目指した。

天然のリボソーム翻訳系は D 体アミノ酸を基質として許容できないため D 体ペプチドや D 体タンパク質を翻訳合成することはできない。そこで、リボソームを構成する 23S rRNA やリボソームタンパク質、アミノ酸を運ぶ tRNA、翻訳因子等へ変異を導入することにより翻訳系の基質許容性を高め、D 体のアミノ酸を基質として利用できる翻訳系へと改良することを試みた。これによって D-アミノ酸からなる鏡像ペプチド、鏡像タンパク質の翻訳合成が実現できれば、鋳型 mRNA の配列を変えるだけで自由自在に、なおかつ短時間でバリエーションのある鏡像ペプチド、タンパク質を一度に作り出すことが可能になり、ペプチド・タンパク質研究にもたらされるインパクトは非常に大きい。さらに、この改良型翻訳系によって D アミノ酸を含むランダムペプチドライブラリを構築し、mRNA ディスプレイ法と組み合わせることにより新規ペプチド医薬開発プラットフォームとして活用することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、(A)D-アミノ酸連続導入のための新型リボソーム翻訳系の開発と、(B)当該新型リボソーム翻訳系を用いたランダム D-ペプチドライブラリの構築および創薬への展開を実現することができた。

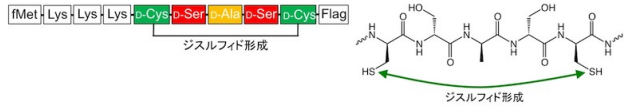
そもそも、従来リボソーム翻訳系においては D-アミノ酸の連続導入は不可能であると考えられており、その要因は複合的かつ多岐に渡るものであった。そのため、本研究ではそれらの個々の要因を解決するための9つのサブプロジェクトを同時に展開し、その中から D-アミノ酸導入効率向上に寄与することが確認できた成果を順次組み合わせることにより新型翻訳系を

構築するという戦略を採った。具体的にはD-アミノアシル tRNA のリボソームへの導入効率を向上させるための tRNA の T ステムの改変、新規翻訳因子 EF-P の導入によるペプチド鎖転移反応の促進、ペプチジル tRNA のリボソームからの脱落を抑制するための翻訳因子 EF-G 濃度の最適化などを行い、これらを組み合わせることにより D-アミノ酸を連続導入可能な新型リボソーム翻訳系の構築に成功した。これにより、D-セリンを10連続で導入したペプチドの翻訳合成に成功したほか、3種類のD-アミノ酸を含む環状Dペプチドの翻訳合成にも成功した(図1)。これらの成果は文献1,2,3において発表した。

1. D-Serの10連続導入



2. 3種類のD-アミノ酸を組み合わせ、ジスルフィド結合を介した環状ペプチドの合成



3. 3種類のD-アミノ酸を組み合わせ、チオエーテル結合を介した環状ペプチドの合成

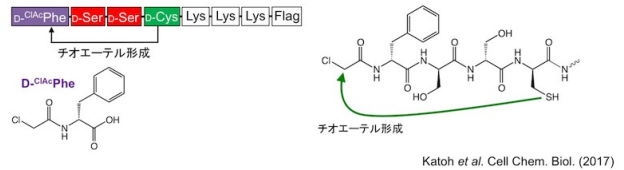


図1: 新型翻訳系を用いて合成に成功したペプチドの例

さらに、今回構築した新型翻訳系を用い、4種類ないし6種類のD-アミノ酸を含むランダム環状Dペプチドライブラリの構築に成功した。翻訳合成された環状ペプチドはピューロマイシンリンカーを介して鋳型であるmRNAと連結することができ、mRNAディスプレイ法と組み合わせることにより創薬標的となる疾患原因タンパク質に特異的に結合するペプチド配列のスクリーニングをハイスループットに行うことができる。D体のペプチドは生体内のペプチダーゼによって容易に分解されないため、生体内安定性の高いペプチド医薬の開発基盤となることが期待される。本研究では、構築した環状Dペプチドライブラリを用いて実際にmRNAディスプレイを実施することに成功しており、得られたペプチドの薬理活性等の評価を今後進める。

(2) 詳細

研究テーマA「D-アミノ酸連続導入を実現する新型リボソーム翻訳系の構築」

リボソーム翻訳系においてD-アミノ酸を連続導入できない理由は主に以下の4つであると考えられる(図2)。すなわち、(1)D-アミノアシル-tRNAのリボソームへの導入(accommodation)が遅いこと、(2)D-アミノ酸を介するペプチド鎖転移反応(peptidyl transfer)が遅いこと、(3)D-アミノ酸を持つペプチジル-tRNAのリボソームからの脱落(mis-translocation)が生じてしまうこと、(4)D-アミノ酸を持つペプチジル-tRNAの加水分解(mis-termination)が生じてしまうこと、が原因である。したがって、D-アミノ酸の導入効率向上を実現するためには、accommodation や peptidyl transfer の過程を促進しつつ、mis-translocation や mis-termination のような望ましくない反応を抑制することが鍵となる。これらの問題点を解決することを目的として本研究では図2、図3に示す9つのサブプロジェクトを並行して実施した。

(1)D-アミノアシル tRNA の accommodation を促進するためのサブプロジェクトとしては、(1a)tRNA の T ステムの改変と(1b)翻訳因子 EF-Tu の改変を実施した。accommodation の過程において、アミノアシル tRNA は翻訳因子 EF-Tu によってリボソームの A サイトに導入されるが、D-アミノアシル tRNA と EF-Tu との結合力が弱いことが accommodation が遅い原因と

考えられる。EF-Tu はアミノアシル tRNA のアミノ酸部分と T ステム部分の2箇所を認識して結合しており、アミノ酸部分の結合力の弱さを T ステム部分の結合力を向上させることで補うことができる(サブプロジェクト 1a)。また、EF-Tu に変異を導入することで D-アミノ酸との親和性を向上させる(サブプロジェクト 1b)。これら2つのサブプロジェクトのうち、tRNA の T ステムの改変によって accommodation が促進されることが確認されたため、その成果を新型翻訳系に採用することとした。

(2)D-アミノ酸の peptidyl transfer を促進するためのサブプロジェクトとしては、(2a)翻訳因子 EF-P の導入、(2b)tRNA の改変、(2c)リボソーム RNA の改変、(2d)リボソームタンパクの改変を実施した。EF-P は天然の翻訳系において連続するプロリン間の peptidyl transfer を促進する翻訳因子として知られているが、その際にプロリル tRNA の D-アームの構造を認識していることを明らかにした(文献1)。そこで、プロリン用の tRNA に D-アミノ酸を人工的にチャージして翻訳系に導入したところ EF-P によって D-アミノ酸の導入効率が劇的に向上することを見出した(文献3)。そのため、その成果を新型翻訳系に導入することとした。

(3)(4)ペプチジル tRNA のリボソームからの脱落および加水分解を抑制するためのサブプロジェクトとしては(3a)翻訳因子 EF-G の濃度の最適化、(3b)新規翻訳因子 EF4 等の導入、(4a)翻訳因子 IF、RF 濃度の最適化を実施した。EF-G は peptidyl transfer 反応後の translocation を誘起する因子として知られるが、D-アミノ酸導入の場合のように peptidyl transfer 反応が非常に遅い場合には peptidyl transfer が完了する前に translocation が生じてしまうために peptidyl-tRNA の脱落が起きてしまうという問題があった。そこで、翻訳系中の EF-G の濃度を最適化し、従来よりも 1/3 程度の濃度に下げることで D-アミノ酸を含むペプチドの翻訳効率を向上させることに成功した。また、RF や IF などの翻訳因子のいくつかはペプチジル tRNA の加水分解を促進することが報告されているため、これらの濃度についても最適化を図った。そして、これらの成果についても新型翻訳系に導入した。

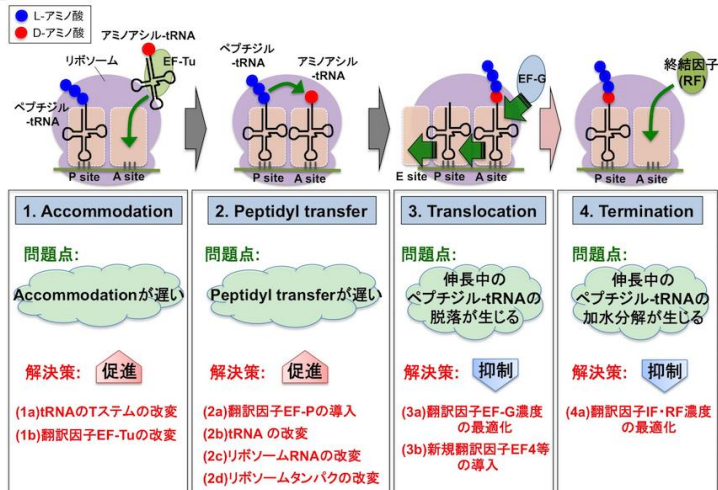


図2: D-アミノ酸導入における問題点とその解決策

1. Accommodationの促進	0% 目標達成度 100%
(1a) tRNAのTステムの改変	100%
(1b) EF-Tuの改変	40%
2. Peptidyl transferの促進	
(2a) tRNAのDアームの改変とEF-Pの導入	100%
(2b) tRNAの改変	70%
(2c) リボソームRNAの改変	40%
(2d) リボソームタンパク質の改変	10%
3. Mistranslocationの抑制	
(3a) EF-G濃度の最適化	100%
(3b) 新規翻訳因子EF4等の導入	60%
4. Misterrminationの抑制	
(4a) IFおよびRF濃度の最適化	100%

図3: 各サブプロジェクトの成果

以上のサブプロジェクトのうち D-アミノ酸導入に効果があると認められた(1a)(2a)(3a)(4a)の成果を統合し新型翻訳系として構築した。そして、この新型翻訳系を用いた D-アミノ酸連続導入の効果を文献3において報告した。

研究テーマ B「新型リボソーム翻訳系を用いたランダム D-ペプチドライブラリの構築と創薬への応用」

研究テーマ A で構築した新型翻訳系を用い、ランダム配列中に D-アミノ酸を導入した環状ペプチドライブラリを作成した。4種類 (D-Ala, D-Ser, D-His, D-Tyr)ないし6種類 (D-Ala, D-Ser, D-His, D-Tyr, D-Phe, D-Thr)の D-アミノ酸を導入した2種類のライブラリを作成し、いずれも N 末端にクロロアセチル D-トリプトファンを導入し、さらにランダム領域の下流にシステインを配置することにより N 末端のクロロアセチル基とシステインの側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成させ環状化させた。翻訳の鋳型となる mRNA の 3' 末端にあらかじめピューロマイシンリンカーを連結しておくことで、翻訳合成されたペプチドと mRNA を共有結合で連結することができる。さらに、mRNA を逆転写し cDNA 化する。この環状ペプチド-mRNA-cDNA 複合体を薬剤標的分子(EGFR)を固定化した磁気ビーズと混合し、標的に結合するペプチド画分のみを回収、PCR によって cDNA を増幅することにより DNA ライブラリを得ることができる(図4)。この一連のセレクションサイクルを6サイクル繰り返すことにより、EGFR に対して特異的に結合するペプチドの候補群を得た。残念ながら6種類の D-アミノ酸を含むライブラリにおいては翻訳効率が低く候補配列が得られなかったが、4種類の D-アミノ酸を含むライブラリを用いた場合には複数のペプチドの候補が得られている。

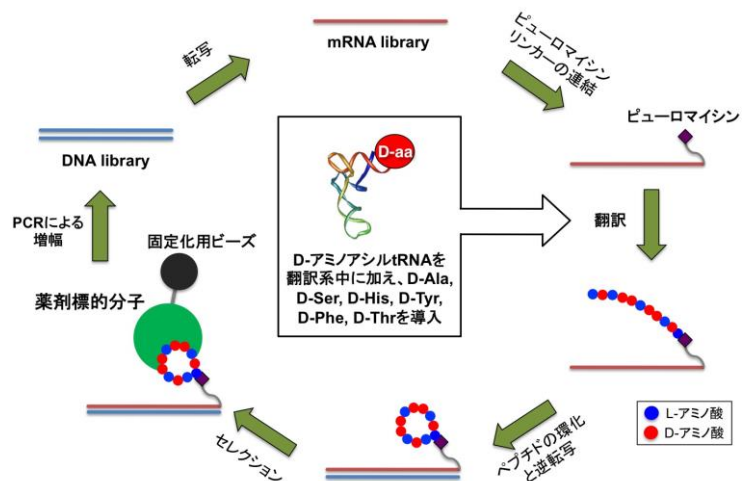


図4: 薬理活性を有するD体ペプチドのin vitroセレクション

3. 今後の展開

本研究により D-アミノ酸のペプチド鎖中への連続導入は達成できたが、タンパク質レベルの長鎖のもの翻訳合成はまだ実現できていないため、今後さらなる翻訳系の改良を施すことにより D-アミノ酸の導入効率を高め、長鎖タンパク質合成を実現したいと考えている。そのためには D-アミノ酸間の peptidyl transfer を促進するための tRNA の更なる改良や、変異リボソーム RNA の開発、accommodation を促進するための変異 EF-Tu の開発などを今後も継続して進める必要があると考える。これにより、全てが D-アミノ酸からなる鏡像タンパク質酵素を作り出すことができれば、さまざまな生体分子の鏡像体を基質とした酵素反応を実現できることになり、生化学や酵素工学の分野において非常に大きなインパクトをもたらすことができる。

また、本研究では EGFR を標的とした環状 D-ペプチドライブラリのスクリーニングによって EGFR

に結合する環状ペプチドの候補群を得ることに成功した。これらのペプチドについては今後 EGFR への結合力や阻害能、血中安定性等の評価を進め、ペプチド医薬として開発を行うことを目指す。環状 D-ペプチドライブラリを用いたペプチドのスクリーニングは当然 EGFR 以外の創薬標的に対しても適用可能であり、今後様々な創薬標的に対するスクリーニングを行う。D-アミノ酸からなるペプチドは天然の L 体ペプチドと比較して圧倒的に生体内安定性が高く、新しいペプチド医薬の開発基盤として非常に有望である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究においては(A)D-アミノ酸を連続導入可能な新型翻訳系の構築、(B)環状ランダム D-ペプチドライブラリの構築とスクリーニング、(C)D 体 DNA ポリメラーゼの翻訳合成と L 体核酸の酵素的合成、の3つを当初の目的としていた。

(A)については D-アミノ酸導入効率向上のための9つのサブプロジェクトを展開し、そのうち4つのサブプロジェクトについて高い成果を得られたためそれらを統合することによって新型翻訳系を構築した。効果の認められなかったサブプロジェクトも存在するが、そもそも全てのサブプロジェクトにおいて成果をあげることは想定しておらず、accommodation、peptidyl transfer、translocation、termination の過程をそれぞれ改善することができたことをもって目標は十分に達成できたと考える。

(B)についても、ランダム D-ペプチドの構築と EGFR に対する阻害ペプチドのスクリーニングを実施し、候補配列を取得できたため、当初の目標を達成したと考える。近年ペプチド医薬は社会的に非常に注目されていることもあり、今後は製薬企業や他大学との共同研究によってさらに加速度的に開発を進められるものと考えている。従来のペプチド医薬の大きな弱点は生体内のペプチダーゼによる分解を受けるために生体内安定性が低いことであるが、D 体のペプチドを新しいペプチド医薬の開発基盤として用いることでこれを克服できる。そのため、本研究の成果は創薬の分野において非常に大きなインパクトを与えるものと評価できる。

(C)については、現状ではタンパク質レベルの長鎖のものを全て D-アミノ酸に置き換えるところまでは実現できておらず目標を達成するには至らなかった。ただし、開発項目(A)が本研究プロジェクトの基幹部分であり、(B)および(C)については(A)の応用事例としての位置づけであることから、(A)と(B)までを達成できたことにより本研究の目標の9割は達成できたと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

リボソーム翻訳系は非常に多くの構成要素からなる複雑な反応系であり、D-アミノ酸が基質として許容されない要因も単一ではなく複合的なものであるため、それらの要因に対して網羅的に対処することが必要となる。そのためのサブプロジェクトを9つ並行して展開した点が本研究の特色である。そして、得られた成果のうち4つを組み合わせることによってD-アミノ酸の導入効率を相乗的に高めることができたことは、本研究の戦略が正しかったことを示唆してい

る。現時点ではタンパク質レベルの長鎖のものの翻訳合成は達成されていないが、今後さらに基質許容性を高める改良を施すことにより実現されることを期待する。

本さきがけ研究者は、これまでもL体の環状ペプチドを用いた創薬研究を多数実施しているが、本研究の成果によってD体ペプチドを用いた創薬を新たに実現できることになり、ペプチド創薬の分野において他の追従を許さない優位性を獲得したと評価できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Katoh, T., Wohlgemuth, I., Nagano, M., Rodnina, M.V., Suga, H. "Essential structural elements in tRNA^{Pro} for EF-P-mediated alleviation of translation stalling." *Nat. Commun.*, 7, 11657 (2016).
2. Katoh, T., Tajima, K., Suga, H. "Consecutive elongation of D-amino acids in translation." *Cell Chem. Biol.*, 24, 46-54 (2017).
3. Katoh, T., Iwane, Y., Suga, H. "Logical engineering of D-arm and T-stem of tRNA that enhances D-amino acid incorporation" *Nucleic Acids Res.*, in press (2017).
4. Shin, B.S., Katoh, T., Gutierrez, E., Kim, J.R., Suga, H., Dever, T.E. "Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis." *Nucleic Acids Res.*, 45, 8392-8402 (2017).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- 1) 第7回 CSJ 化学フェスタ (2017) 「鏡像タンパク質および鏡像核酸を合成するための分子技術の開発」
- 2) 日本化学会 第97春季年会 (2017) 「鏡像タンパク質および鏡像核酸を合成するための分子技術の開発」
- 3) RNA 2016 (2016) "Essential structural elements in prolyl-tRNA^{Pro} for EF-P-mediated translation enhancement"
- 4) 18th Tokyo RNA club (2016) "Essential structural elements in prolyl-tRNA^{Pro} for EF-P-mediated translation enhancement"