

## 論文の内容の要旨

論文題目 Ribosomal Syntheses of Peptides with Lysine Modifications and Cyclic Peptides Containing *D*-Amino Acids and Its Application

(リシン修飾をもつペプチドと *D*-アミノ酸を含む環状ペプチドの翻訳合成とその応用)

氏 名 湯 澤 賢

### 序文

翻訳系の改変に関する研究の歴史は長く、その第一歩は私の知る限り 1951 年まで遡る。Levine と Tarver はこの年、非タンパク質性アミノ酸であるメチオニンアナログ、エチオニンが実際にタンパク質に導入されることを *Journal of Biological Chemistry* 誌に報告している。これは、Watson と Crick が、DNA は二重螺旋構造をしていると *Nature* 誌で報告する数年前の話である。その後、1989 年の Schultz ら、Chamberlin らの研究を皮きりに、この研究分野は目覚ましい発展を遂げた。現在では翻訳機構を巧みに利用して、複数種類の非タンパク質性アミノ酸をペプチドやタンパク質に同時に導入することも可能である。学位論文の第 1 章では、この技術を次世代遺伝学として注目を集めるエピジェネティクスの研究に応用した例を記述する。一方で、翻訳系はペプチドやタンパク質を基盤とした巨大な化合物ライブラリを扱うのに適している。その多様性は  $10^{12}$  を越える。学位論文の第 2 章では、非タンパク質性アミノ酸である *D*-アミノ酸を含む環状ペプチドライブラリから、様々な疾患に関わるとされる酵素に結合するペプチドリガンドを探索した結果を述べる。

本研究の柱は、遺伝暗号リプログラミングという遺伝暗号をつくり変える技術である。遺伝暗号リプログラミングによって翻訳系の改変は達成される。したがって、まず遺伝暗号リプログラミングについて概説した後、第 1 章、第 2 章についてそれぞれ具体的に述べる。

### 再構成無細胞翻訳系を利用した遺伝暗号リプログラミング

Ueda らは、開始因子や伸長因子、終止因子、さらにはリボソームや tRNA、アミノ酸など、大腸菌の翻訳系に必要な因子をそれぞれ精製し、再度混ぜ合わせることで翻訳系を構築できることを 2001 年、*Nature Biotechnology* 誌に報告した（著者らはこの再構成無細胞翻

訳系を PURE システムと呼んでいる)。PURE システムの最大の特徴は、翻訳系の組成を自由に変えられることである。

ここで、20 種類のアミノ酸のうちイソロイシンを含まない PURE システムを構築した場合を考えてみる（当研究室ではこの任意のアミノ酸を含まない PURE システムを wPURE システムと呼んでいる）。この wPURE システムでは、mRNA 配列中にイソロイシンのコドンがある場合、当然ながら翻訳は走らない。しかしながら、イソロイシンのコドンと塩基対を形成するアンチコドンをもつアミノアシル tRNA を系中へ加えれば、mRNA 配列に対応するペプチドやタンパク質を翻訳合成することができる。この時、必ずしもイソロイシンをアシル化した tRNA を用いる必要はない。非タンパク質性アミノ酸をアシル化した tRNA を用いた場合でも、アミノ酸に依存するが、翻訳が走ることをわれわれを含め、Forster ら、Szostak らが報告している。この場合、イソロイシンのコドンは、イソロイシンではなく、非タンパク質性アミノ酸に割り当てられたことになる。このようにして遺伝暗号リプログラミングは達成される。

#### 遺伝暗号リプログラミングに汎用性を与えるフレキシザイムシステム

遺伝暗号リプログラミングを行うには、非タンパク質性アミノ酸をアシル化した tRNA が必要である。われわれは、非タンパク質性アミノ酸の tRNA へのアシル化を触媒するリボザイム、フレキシザイムを開発し、2006 年 Nature Methods 誌に報告した。フレキシザイムは、カルボキシル基が活性化されたアミノ酸の活性化基のみを認識するため、どのような側鎖をもつ非タンパク質性アミノ酸でも基質として利用することができる。tRNA に関しては、3'末端にある 3 塩基のみを認識する。したがって、フレキシザイムを用いれば、任意の非タンパク質性アミノ酸を望みのアンチコドンをもつ tRNA にアシル化することができる。また、その操作が簡便であることもフレキシザイムを用いる手法の特徴であり、結果として遺伝暗号リプログラミングが容易になる。

#### 第 1 章

ヒストン H3 は、DNA とともに染色体を構成するタンパク質の 1 つであり、N 末端側を構成するテールドメイン（ヒストン H3 テール）と C 末端側を構成する球状ドメインからなる。これまでの研究から、ヒストン H3 のメチル化は、4 番目、9 番目、27 番目、36 番目のリシン残基など、そのほとんどがヒストン H3 テールで起こることが知られている。また、リシン側鎖が受けるメチル化には、モノメチル化、ジメチル化、トリメチル化があり、それらメチル化の状態によってもヒストン H3 が細胞に与える影響が異なることが次第に明らかになっている。例えば、ヘテロクロマチンプロテイン 1 は、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のトリメチル化を特異的に認識して結合し、近傍の DNA の転写を抑制することが報告されている。その他にも、WDR5 など、いくつかのタンパク質がリシン残基の位置、メチル化の状態特異的に結合し、様々な細胞機能を制御することが明らかになってきた。

これまで述べてきた研究では、固相合成法によって合成された 15~20 残基のヒストン H3 テールを用い、タンパク質との相互作用解析を行っている。固相合成法により、目的の位置にメチルリシンを含むヒストン H3 テールを合成できるからである。しかしながら、ヒストン H3 テールの全長は 40 残基程度であり、現在用いられているヒストン H3 テールはその半分の長さに相当する。これは、一般的にペプチドの長さが 20 残基を越えると、その合成が非常に困難になるためである。そこで、われわれは、翻訳系がもともとタンパク質の合成系であるという利点を生かし、遺伝暗号リプログラミングにより、任意の位置にモノメチルリシン、ジメチルリシン、トリメチルリシンを含む全長のヒストン H3 テールを翻訳系で合成する手法の開発を試みた。

ヒストン H3 テールは、イソロイシン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギンなどを除く 11 種類のアミノ酸で構成されている。そこで、イソロイシンのコドンをもノメチルリシンに、トリプトファンのコドンをもジメチルリシンに、フェニルアラニンのコドンをもトリメチルリシンに割り当てた。また、ヒストン H3 テールのリシン側鎖はアセチル化されることも知られているので、アスパラギンのコドンをもアセチルリシンに割り当てた。その結果、目的の位置に修飾リシンを最大で 4 つ含むヒストン H3 テールの翻訳合成に成功した。

次に、翻訳系により合成したヒストン H3 テールが、先に述べたヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) との相互作用解析に利用できるかを表面プラズモン共鳴解析により検討した。その結果、期待通り、HP1 の結合には 9 番目のリシン残基のトリメチル化が重要であることを定性的、定量的に確認できた。

## 第 2 章

ヒトトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) は、カルシウム濃度に依存して、グルタミン側鎖のアミド基と求核性の官能基との反応を触媒する酵素である。これまでの研究から、TG2 は、欧米では 100 人に 1 人が悩まされているセリアック病やハンチントン病、アルツハイマー病などの神経疾患、ある種のがんとの関わりが指摘されており、重要な薬剤標的として注目を集めている。そこで本研究では、mRNA ディスプレイを用いてヒトトランスグルタミナーゼ 2 の阻害剤の探索を試みた。

mRNA ディスプレイは 1997 年に Szostak ら、Yanagawa らによって開発された技術である。概念的に説明すれば、翻訳を *in vitro* で行うファージディスプレイである。この技術では、遺伝型が表現型であるペプチドにピューロマイシンを介して結合しており、ペプチドが系中に数分子あれば、PCR で増幅することができる。したがって、 $10^{12}$  を越える極めて多様なペプチドライブラリを扱うことができる。本研究では、*D*-アミノ酸を含む環状ペプチドライブラリを用いることにした。*D*-アミノ酸を含む環状ペプチドは、生体安定性や細胞膜透過性の向上が期待できるからである。この特殊な環状ペプチドライブラリを構築するために、クロロアセチル基をもつ非タンパク質性アミノ酸、ClAc-DY をメチオ

ニンのコドンに割り当てた翻訳系を利用した。クロロアセチル基は、分子内にチオール基がある場合、速やかに反応してチオエーテル結合で環状化したペプチドを与えることをわれわれはこれまでに明らかにしている。われわれはおよそ  $10^{12}$  の多様性をもつこの環状ペプチドライブラリを用いて、TG2 に対するペプチドアダプターのセレクションを行った。その結果、ClAc-<sup>D</sup>YLLLPR(Y/F) $X_n$ HXC ( $n = 2$  or  $3$ )、もしくは ClAc-<sup>D</sup>YXPLLX<sub>4</sub>HXC という共通配列をもつペプチドの濃縮が確認できた。表面プラズモン共鳴解析で後者の共通配列をもつ環状ペプチドの TG2 への結合を検討解析したところ、約 130 nM の解離定数をもつことが確認された。しかしながら、得られた環状ペプチドは、TG2 の酵素活性を阻害しなかった。おそらく、触媒活性をもつタンパク質ドメインには結合していないのだろう。

阻害剤として機能しなかったのは残念であるが、改変翻訳系において mRNA ディスプレイが行えたことは、まぎれもない事実である。今後は、この技術をさらに改良することでペプチド薬剤を迅速に創製するための技術にしていきたい。