

論文の内容の要旨

論文題目 Development of the novel translation strategies for the cyclic
modification of peptides at the C-terminus
(C 末端閉環修飾ペプチドの新規翻訳合成戦略の開発)

氏 名 中島 永二

【序】

ペプチドは生体内において、種々のタンパク質と相互作用することで、様々な生理活性を示す。これまでに、極めて多くの種類の生理活性ペプチドが同定・開発されている。例えば、高等動物体内では、多種多様なペプチドがホルモンやサイトカインとして、生体内の恒常性維持に貢献していることが知られている。また、微生物の二次代謝産物の中には薬剤の候補となりうるペプチドが多く存在し、実際にこれらの骨格に基づいた抗腫瘍ペプチド薬剤なども数多く開発されている。これらのペプチドは通常のタンパク質翻訳系によって合成されるペプチドとは異なり、D 体アミノ酸などの非天然アミノ酸や環状骨格などのユニークな構造を有するのが特徴である。一方でペプチドの生理活性は、生体内での安定性に大きく依存し、*in vitro*で見られた活性が *in vivo*において著しく低下することもしばしば起こる。これはペプチド鎖が、生体内に存在するプロテアーゼ等で急速に加水分解され、十分な生理活性を発揮することができないためである。しかし、N および C 末端に特殊な修飾あるいは環状骨格が施されたペプチドは、無修飾のものと比較して多くがターゲットとの親和性に優れ、生体内安定性や細胞膜透過性にも長けている。

一方近年、我々や他の研究グループによって、特殊な翻訳系を用いて遺伝暗号をリプログラミングし、複数の非タンパク質性（非天然）アミノ酸を含んだ特殊ペプチドが合成可能であることが数多く報告されている。そこで本研究では、翻訳系の応用の可能性をさらに広げるべく、遺伝暗号リプログラミングを用いたペプチド C 末端修飾/環状化技術の確立、さらにその技術を応用し、これまで翻訳合成が困難であった環状化 γ ペプチドの合成を目指した。この目的を達成するため、筆者は非天然アミノ酸およびヒドロキシ酸を含むペプチド、いわゆる特殊ペプチドをリボソームにより合成し、新たに導入された官能基を用いてペプチドを環状化/修飾する戦略をとった。

【C末端ラクタム/チオラクトン化およびチオラクトンを介したアシル化ペプチドの合成】

ペプチドC末端の環状化戦略として、まず翻訳ペプチドC末端におけるラクタム化およびチオラクトン化を検討した。固相法によるC末端修飾ペプチドの合成を行う場合、N末端や主鎖の窒素原子とレジンとを結合させフリーのC末端とラクタム/チオラクトンなどの任意の官能基とのカップリングによる手法が主に用いられている。しかし翻訳反応の場合、アミノ酸残基のC末端はtRNAと結合しているためC末端に修飾を受けたアミノ酸を直接的にカップリングさせることは不可能である。そこでペプチド内部にエステル結合を導入し、直近側鎖の分子内求核反応による環状化を誘導し、C末端に5/6員環ラクタムおよびチオラクトンをもつペプチドを合成できないかと考えた(図1)。そこでまず、側鎖のアミノ基あるいはチオール基が還元的に除去可能な保護基によって保護された4種類のアミノ酸 azidohomoalanine(Aha), azidonorvaline(Anv), 2-mercaptoethanol-homocysteine(Hcy(ME)), 2-mercaptoethanol-mecaptonoevaline(Mnv(ME)) および α -ヒドロキシ酸 (Phe^{lac}) を連続的にペプチドへ導入する必要があるが、mRNA配列依存的にこれら合成するにはこれら4種類の非天然アミノ酸と α -ヒドロキシ酸を含む遺伝暗号を構築する必要がある。そこで私は、フレキシザイムとPURE systemという技術を用いる事でこれを達成し、mRNA配列依存的ポリエステル合成を達成しようと考えた。

フレキシザイムとは、当研究室で開発された人工リボザイムであり、アミノ酸を tRNA の 3'-水酸基へとアシル化する反応を触媒する。このフレキシザイムは、カルボン酸を弱く活性化したアミノ酸を基質にするが、その際活性基のみを認識に使い、 α 位と側鎖をその認識に使用しない。従って、原則的にあらゆる側鎖構造をもつ α -ヒドロキシ酸を基質にする事ができる。また、tRNA に関しても 3'末端にある共通配列(5'-ACC-3')のみを認識しているため、あらゆる tRNA を基質にする事ができる。すなわち、フレキシザイムを用いる事で、望みの組み合わせでの α -ヒドロキシアシル tRNA の調整が可能になると考えられる。PURE system とは大腸菌由来の無細胞翻訳系であり、精製された翻訳因子により再構成されている。そのため、必要に応じて特定の因子を加えたり除いたりする事ができる。私は PURE system からアミノ酸やアミノアシル tRNA 合成酵素(ARS)をから除く事で、アミノアシル tRNA 合成を阻害し、それによりコドンとアミノ酸の対応関係を解消する事ができると考えた。さらに、これらのアミノ酸に置き換わるように前述の α -ヒドロキシアシル tRNA を加える事で、遺伝暗号をアミノ酸からヒドロキシ酸へと書き換える事ができると考えた。

まず、上記4種類の非天然アミノ酸を Thr のコドンに対応する tRNA へ、また Phe^{lac} を Lue のコドンに対応する tRNA へアシル化し、Thr と Lue を取り除いた PURE system へ加え、改変遺伝暗号のもとで翻訳反応を行った。MALDI-TOF MS による質量分析の結果、それぞれの非天然アミノ酸およびヒドロキシ酸が連続的に導入された目的のペプチドエステルの合成が確認された。続いて tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を用いて上記ペプチド内 Aha, Anv, Hcy(ME), Anv(ME)の側鎖の保護を還元的に除去し、pH 9, 37℃で数時間

反応させ、求核性側鎖による C 末端分子内環状化を試みた。質量分析の結果、期待通り C 末端に 5/6 員環ラクタムおよびチオラクトンをもつペプチドの合成が確認された。

またこれら 4 種類の環状骨格の中でも 5 員環チオラクトン（ホモシステインチオラクトン, HTL）は非常に反応性に富み、そのカルボニル炭素は一級アミンによる求核攻撃を受けやすく、開環と同時にアミド結合を形成することが知られている。そこで筆者はこの HTL の高い反応性に着目し、HTL をスキヤフォールドとしたペプチド C 末端への一級アミンによる翻訳後修飾を試みた。まず上記のように HTL ペプチドを翻訳合成し、その翻訳溶液中に 50-100 mM の多様なアシル基を有した一級アミンを添加し、室温で数時間反応させた。その後 FLAG タグ精製し質量分析を行った結果、いずれの一級アミンの場合においても C 末端に修飾が施されたペプチドがほぼ定量的に合成されていることが確認された。

【チオエステル法による環状化 γ ペプチドの翻訳合成】

筆者は C 末端閉環ペプチド翻訳合成の更なる展開として、ペプチド内チオエステル結合を介して環状化 γ ペプチドを翻訳合成できないかと考えた。天然の生理活性物質や既存のペプチド模倣薬の中には主鎖骨格として γ アミノ酸を含むものが少なくない。中でもスタチンと呼ばれる γ アミノ酸はレニン（アスパラギン酸プロテアーゼ）阻害剤として知られる Pepstatin などに含まれ、生理活性を司るキー構造となっている。したがって γ ペプチドには薬剤の候補化合物となりうるポテンシャルがあり、翻訳ペプチドライブリーの構成要素に加えるべき魅力をもった化合物といえる。しかしながら、ここで問題となっているのは γ アミノ酸が tRNA に捕捉されにくいという事実である。筆者は予備実験において、 γ 位にアミノ基などの求核性官能基をもつ数種類のアミノ酸によるアミノアシル化を検討したが、いずれも十分な収率のアミノアシル化 tRNA は得られなかった。tRNA と形成したエステル結合に γ 位の求核基が反応し分子内環化反応とともに tRNA から脱離してしまっていることが考えられた。一方近年、相本らによって、Cys-Pro-G^{OH} (G^{OH}=グリコール酸) のトリペプチドユニットが 2 つのアシル転移反応を経て自発的にチオエステルへと変換することが報告されていた。また既に本研究室の川上・太田により同手法を翻訳ペプチドに応用しチオエステルが構築できることが知られていた。そこで筆者は翻訳系を用いて γ アミノ酸をペプチド内に導入するために、以下のような戦略を立てた。(図 2) ① γ アミノ酸- α アミノ酸のジペプチドを合成し tRNA にアシル化する。②翻訳開始反応により N 末端にジペプチドを導入すると同時にペプチド内部に Cys-Pro-G^{OH} を導入する。③N 末端 γ アミノ基と C 末端チオエステルとの縮合により主鎖環状化ペプチドを合成する。まずに 6 種類の γ アミノ酸（スタチン誘導体）を含むジペプチドの活性エステル体を合成し、フレキシザイムの基質となるようにし、フレキシザイムによるアシル化を行った。次に、C 末端に FLAG 配列をもったモデルペプチドの N 末端にこれらのジペプチド、および内部に Cys-Pro-G^{OH} を翻訳導入し精製した。続いて、同ペプチドを pH 9、37℃、MPAA 存在下で 12 時間反応させた。質量分析の結果、すべての基質において目的の γ アミノ酸を主鎖骨格

に含んだ環状化ペプチドが合成されていることが確認された。本手法の確立により、 γ アミノ酸に限らずこれまで翻訳導入が困難であった様々な長鎖アミノ酸をペプチド中に導入するための強力なツールになると考えられる。

【まとめ】

本研究では、フレキシザイムと PURE system を組み合わせることで、種々の官能基を持った非天然アミノ酸を翻訳合成によりペプチド中に導入することができた。また、これらの官能基を分子内で反応させることで様々な骨格をペプチドに導入・付与することに成功した。C 末端環状化および多様なアシル基による修飾反応はペプチドの安定性を向上させるだけでなく、ペプチドに新たな生理活性や機能を付与することも可能である。また、既存のスクリーニング系によって得られたペプチドアプタマーの C 末端構造の最適化にも応用可能であろう。またチオエステル法を用い、これまで困難であった γ アミノ酸のペプチドへの翻訳導入を達成することができた。これまで γ ペプチド薬剤の開発は主に化学合成に頼られており、高多様性ライブラリーからのスクリーニングは行われていない。翻訳反応によるペプチド合成の最大の利点は、非常に高多様のライブラリーを作製できることにある。mRNA 中にランダムな配列を持たせることで、安定な環状化 γ ペプチドライブラリーを用意に構築できるであろう。しかるべきアッセイ系と組み合わせることで、アゴニスト、あるいはアンタゴニスト活性のある環状化ペプチドをスクリーニングすることが可能となるであろう。

図 1

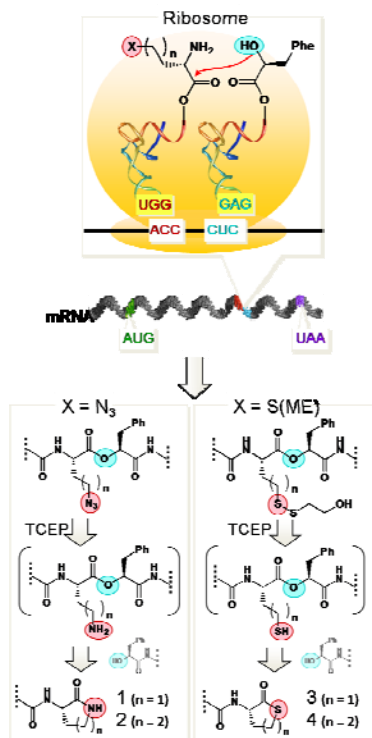


図 2

