

Genetic code reprogramming: An emerging technology for the discovery of a new class of peptide drugs

東京大学・先端科学技術研究センター
菅 裕明

The lecture describes a new means to reprogram the genetic code, which enables us to express “non-standard” peptides containing multiple non-proteinogenic amino acids. To execute the genetic code reprogramming, we developed an artificial RNA enzyme (ribozyme), referred to as “flexizyme” capable of aminoacylating tRNAs. The most notable feature of flexizyme is its versatility; it is able to charge virtually any amino acids onto tRNAs bearing various anticodons. Moreover, the flexizyme also charges amino acids with non-proteinogenic sidechain, D-amino acids, N-alkyl-amino acids, and hydroxy acids onto tRNA. Thus, the reassignment of such non-proteinogenic amino acids to desired codons open a new opportunity to synthesize various non-standard peptides using the translation apparatus. We also integrated this unique enzyme system with a specially reconstituted *E. coli* cell-free transcription-translation coupled system, from which certain amino acids (occasionally their cognate aminoacyl-tRNA synthetases) were withdrawn to vacant the corresponding codons. By the integration of these two systems, any desired amino and hydroxy acids can be reassigned to the vacant codons, and we have recently showed that a wide variety of non-standard peptides can be expressed from mRNAs under the reprogrammed genetic code. The lecture also describes applications of the methodology to the ribosomal generation of cyclic peptides closed by a linkage between the N-terminus and Cys sidechain or a linkage between the N-terminus and C-terminus (backbone-cyclic peptides).

自然界に存在するペプチドは、細胞間の情報伝達や生体恒常性の維持、抗菌作用など幅広い生理活性を示す物質として古くから認知されていた。現在、新たな創薬シーズを求め、生体試料や微生物から生理活性ペプチドを発見しようと盛んに研究が行われている。今までに発見された薬剤性ペプチドの構造に注目すると、20種類の天然アミノ酸以外に、N-メチルアミノ酸やD-アミノ酸、N末端アシル基、大環状構造などの独特な構造が多く見いだされる¹⁾。このような特殊構造が、ペプチドの生理活性に重要なキーポイントであることは疑いの余地がなく、医薬品開発に向けての応用が期待される。このような天然物ペプチドの合成は、化学合成ではしばしば困難を極め、天然由来の抽出物にそのシーズを求めざるを得ず、これまで十分な配列空間の探索がされてきたとは残念ながら言えない。

薬剤開発の標的となる生体分子の多くはタンパク質である。これは、タンパク質が生体内で様々な機能を果たしており、細胞内はもちろん細胞表面、血液中などあらゆる場所に局在しているため、標的にしやすいからである。そして、現在市販されている医薬品の多くは、分子量がおおよそ 500 Da 以下の有機低分子化合物である。これは、低分子化合物であるため体内への吸収が素早く細胞内への透過性が高い上、免疫原性を示さないことに起因する。これとは対照的に、近年注目されている抗体医薬は、免疫原性を生じる可能性があること、また標的が細胞外や細胞表面に制限されることが問題となり、薬剤としての応用が限られる。また、標的タンパク質の mRNA を特異的に切断することができる siRNA においても、分解すること無く特定の細胞内に輸送すること難しく、大きな障害となっている。応用の広さやコストを考慮した場合、

タンパク質を標的とした低分子化合物がこれからも医薬品開発の主流であり続けるだろう。

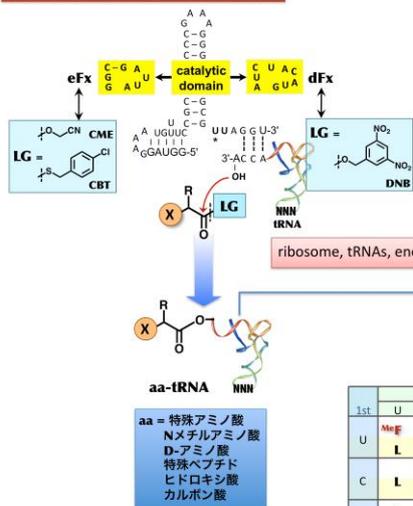
一般的に、ペプチドは有機低分子化合物より分子量が大きい(1~3 kDa)ため膜透過性が悪いこと、またプロテアーゼによって加水分解されることが知られており、薬にならないと言われてきた。しかし、サイクロスポリンに代表される天然物ペプチドは、細胞内の酵素を標的として顕著な生理活性を示す。これは、ペプチドの構造が剛直な環状ペプチドであることに加え、非天然アミノ酸がその構成要素に含まれているため、プロテアーゼ耐性をもち、生体内に安定に存在することに起因する。つまり、天然物ペプチドは細胞外だけでなく細胞内の標的にも対応可能なポテンシャルを有していると言える。一方、生命現象の多くがタンパク質-タンパク質相互作用によって調節されているため、その重要な相互作用を阻害する薬剤開発が盛んに行われている²⁾。この相互作用において、タンパク質は互いに広い表面積を介して結合するため、低分子化合物から効果的な阻害剤を創製することは困難であると考えられてきた。しかしながら、天然物ペプチドは分子自身がある程度大きく、もしくはそのように設計しやすいため、タンパク質の広い結合部位に対して効果的に結合しうる可能性を有している。つまり、天然物ペプチド、あるいはそれに近い特徴をもった擬天然物ペプチドは、細胞内外そしてタンパク質-タンパク質相互作用まで幅広く対応可能であり、創薬シーズとして非常に魅力的な化合物であるといえる。

これら天然物ペプチドは、自然界の細菌やカビ等が有する非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)と呼ばれる酵素群を用いて合成している¹⁾。この系は、通常のペプチド翻訳合成系とは異なり、鋳型依存的な重合反応ではなく(すなわち mRNA を鋳型としてペプチドを重合するのではなく)、規則正しく並んだ酵素がベルトコンベアーのように基質を隣に受け渡してペプチド重合反応を行う。これらの酵素は、決められたペプチド配列を合成するために最適化されているため、様々な配列を有する天然物ペプチドを自由自在に合成することはできない。酵素を改変し基質特異性を変化させる試みも盛んに行われてきているが、高い多様性をもちうるライブラリーを構築するまでの技術には未だ至っていない。

近年、我々は翻訳系を用いて「擬天然物ペプチド」を合成する技術を開発した。ここでいう、「擬天然物ペプチド」とは、天然物ペプチドとは正確な構造こそ異なるが、マクロ環状構造を有し、またその主鎖骨格に N メチルアミド基を有するペプチドで、天然物ペプチドの特徴をまねた特殊な構造をもつペプチドである。これを総称し、我々は「特殊ペプチド」と呼んでいる。翻訳ペプチド合成系は、細胞内で普遍的に行われているタンパク質合成系であり、遺伝情報をコードした mRNA を鋳型としてリボソームが 20 種類の天然アミノ酸を順番に重合することでタンパク質が合成されている。リボソームによる重合速度は非常に速く(40 残基/秒)、また間違ったアミノ酸を重合する確率は 10^{-4} と言われている。つまりリボソームは、迅速かつ正確な配列制御のもと多種類のビルディングブロックをつなぎ合わせる事が可能な重合装置と見なすことができる。そして翻訳合成の最大の利点は、ペプチドライブラリーの構築および活性ペプチドのスクリーニングを容易に行えることである。鋳型である mRNA を変えるだけで様々な構造を有するペプチドを合成できるため、ランダム配列を含む mRNA (もしくは対応する DNA)

を用いて翻訳合成を行えば、ランダムペプチドライブラリーを容易に構築することができる。また mRNA は、分子生物学的手法を用いることで増幅及び配列決定が可能であるため、化合物の再合成や同定も簡便である。また、ディスプレイ技術を用いることで mRNA と対応する特殊ペプチドを結びつけることができる。この翻訳合成系の利点を最大限活用し、我々が独自に開発した tRNA アシル化 RNA 触媒、フレキシザイムを用いて遺伝暗号のリプログラミングを行うことで (図 1)、特殊ペプチドのライブラリー構築と薬剤標的に高い結合能をもつ特殊ペプチドの探索を可能にする RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) ディスプレイの開発に至った (図 2)。本講演では、上記の一連の技術開発に至った背景、これまでの成果を総括的にまとめ、薬剤探索への応用を論じたい。

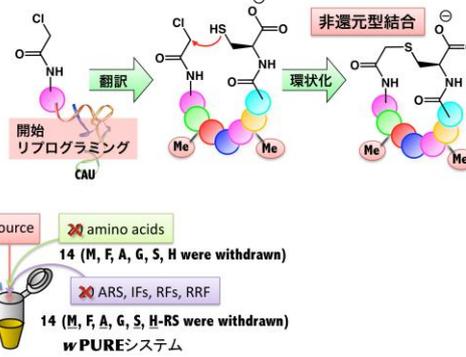
フレキシザイム(1997~2006)



遺伝暗号リプログラミング(2003~)

対応させる。dFx は、アミノ酸に 3,5-ジニトロベンジルエステルでアシル化した基質に触媒活性を示し、eFx より広範囲な側鎖に対応できるフレキシザイムで、一般的には dFx を用いてアシル化 tRNA を合成する。遺伝暗号リプログラミング (2003~) は、フレキシザイム技術に不完全再構成無細胞翻訳系を組み合わせることで、空コドンに非蛋白質性アミノ酸をアサインし、遺伝暗号表を人工的に作製する技術である。特殊ペプチドの翻訳合成 (2004~) は、開始コドンに N-(2-クロロアセチル)-アミノ酸、伸長コドンに複数の N-メチルアミノ酸をアサインすることで、生体内で安定な非還元型チオエーテル結合を有する大環状特殊ペプチドを翻訳合成する技術である。

特殊ペプチドの翻訳合成(2004~)



	1st	2nd	A	G	3rd
U	MeE L	MeS	Y Stop	C W	U C A G
C	L	P	MeH Q	R	U C P A G
A	I P Me	T	N K	S R	U C P A G
G	V	MeA	D E	MeG	U C P A G

図1 翻訳系「分子技術」開発の主要技術

フレキシザイム (1997~2006) は、RNA 酵素 (リボザイム) で、その 3' 末端の塩基が tRNA の 3' 末端配列 CCA と塩基対を形成することで tRNA に結合する。フレキシザイムには、アミノ酸基質の選択性によって 2 種類 eFx と dFx がある。eFx は、アミノ酸にシアノメチルエステル (CME) あるいは 4-クロロベンジルチオエステル (CBT) を有するアミノ酸に触媒活性を示すリボザイムである。一般的には、フェニルアラニン類似体のような芳香環を有する基質に対しては CME を、嵩高いアルキル側鎖をもつアミノ酸には CBT を

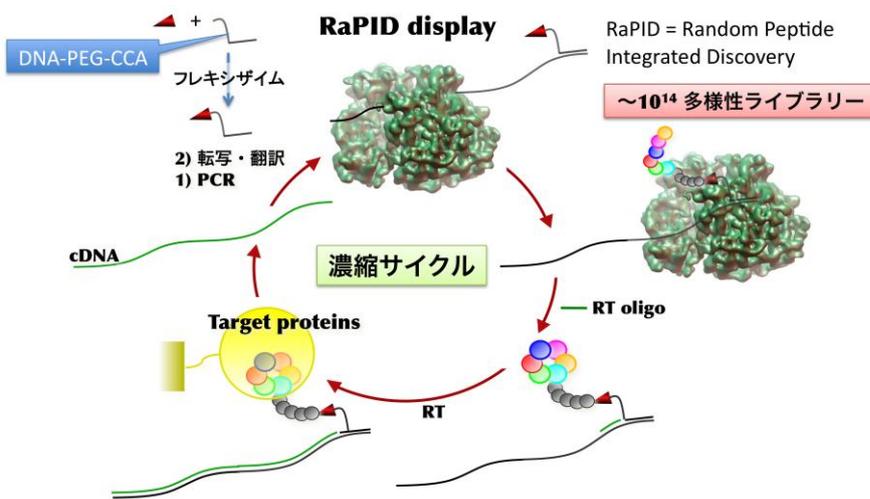


図2 RaPID ディスプレイ 本技術は図1で記載した遺伝暗号リプログラミング技術を駆使し、mRNA 上に環状特殊ペプチドを提示する技術である。一連の濃縮サイクルを繰り返すことで、高多様性ライブラリーから疾患標的の蛋白質へ結合する環状特殊ペプチドを迅速に濃縮することができ、濃縮された cDNA の配列を解析することで容易に活性種となった配列の同定が可能となる。迅速さ、容易さ、低コスト等を達成した次世代薬剤候補スクリーニング技術といえる。

参考文献

- T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga* "Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming" **Nature Chemical Biology** 5, 888-890 (2009)
- N. Niwa, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga* "A flexizyme that selectively charges amino acids activated by a water-friendly leaving group" **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter** 19, 3892-3894 (2009).
- Y. Goto, K. Iwasaki, K. Torikai, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of dehydrobutyrine- and methylanthionine-containing peptides" **Chemical Communication** 3419-3421 (2009).
- Y. Yamagishi, H. Ashigai, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of cyclic peptides with a fluorogenic oxidative coupling reaction" **ChemBioChem** 10, 1469-1472 (2009).
- E. Nakajima, Y. Goto, Y. Sako, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of peptides with C-terminal lactams, thiolactones, and alkylamides" **ChemBioChem** 10, 1186-1192 (2009).
- Y. Goto, H. Suga* "Translation initiation with initiator tRNA charged with exotic peptides" **Journal of the American Chemical Society**, 131, 5040-5041 (2009).
- H. Murakami, A. Ohta, H. Suga* "Bases in the anticodon loop of tRNA(GGC)(Ala) prevent misreading" **Nature Structural & Molecular Biology**, 16, 353-358 (2009).
- T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" **Journal of American Chemical Society** 130, 16861-16863 (2008).
- T.-J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga* "Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers" **Chemistry & Biology** 15, 1166-1174 (2008).
- A. Ohta, H. Murakami, H. Suga* "Polymerization of α -hydroxy acids by ribosomes" **ChemBioChem** 9, 2773-2778 (2008).
- H. Xiao, H. Murakami, H. Suga, A. R. Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" **Nature** 454, 358-361 (2008).
- Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Initiating translation with D-amino acids" **RNA** 14, 1399-1410 (2008).
- Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" **Journal of American Chemical Society** 130, 7932-7934 (2008).
- T.-J. Kang, H. Suga* "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" **Biochemistry and Cell Biology** 86, 92-99 (2008).
- A. Ohta, Y. Yamagishi, H. Suga* "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" **Current Opinion in Chemical Biology** 12, 159-167 (2008).
- Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga* "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" **ACS Chemical Biology** 3, 241-249 (2008).
- Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga* "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" **ACS Chemical Biology** 3, 120-129 (2008).
- T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga* "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" **Chemistry & Biology** 15, 32-42 (2008).
- A. Ohta, H. Murakami, E. Higashimura, H. Suga* "Synthesis of polyester by means of genetic code reprogramming" **Chemistry & Biology** 14, 1315-1322 (2007).
- M. Ohuchi, H. Murakami, H. Suga* "The flexizyme system: A highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus" **Current Opinion in Chemical Biology** 11, 135-144 (2007).
- H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga* (2006) "The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the synthesis of nonnatural peptides" **Nature Methods** 3, 357-359.