

特殊環状ペプチドの翻訳合成と医薬品探索への展開

林 剛 介, 大 城 幸 紀, 菅 裕 明

天然物として単離される生理活性ペプチドの多くは、非タンパク質性アミノ酸や環状構造等の特殊な構造を有する。このような構造は、通常のタンパク質性アミノ酸のみから構成されるペプチドではみられない生体内での安定性やユニークな生理活性の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。これら「特殊ペプチド」は、近年新たな創薬シーズとしてアカデミアのみならず製薬業界からも大きな注目を浴びている。しかし、このような特殊ペプチドを合成する方法論は生合成系の改変あるいは古典的な化学合成法に依存せざるを得ず、多様性に富んだライブラリー合成法としては様々な課題を残している。本稿では、この課題に遺伝暗号リプログラミングという全く異種のコンセプトのもと、翻訳系を用いて簡便に高多様性特殊ペプチドライブラリーを創製し、さらに生理活性特殊ペプチドを安価に且つ効率よく探索する新技术「RAPID システム」を紹介する。

1. はじめに

近年の科学技術の目覚ましい発展は、生命科学研究の進歩を加速させ、人類に膨大で新しい知識を提供し続けている。生命を科学の言葉で語るにはまだまだ不十分ではあるが、我々人類は生命の複雑なメカニズムに対して、着実に理解を深めている。この事実は、創薬研究にも強く影響を及ぼしており、合理的に設計された医薬品「分子標的治療薬」の創成を可能にしつつある。解明された生体メカニズムを基に標的分子（ほとんどがタンパク質）に対して作用する薬を創るわけだが、現在その医薬品開発の主流は有機低分子化合物である。これは、有機低分子化合物の開発・製造コストが比較的安価で、低分子であるため細胞膜を透過して体内への吸収が経口投与によって可能であり、また、免疫原性も持たないという長所を持っているからであ

る。その一方で、標的タンパク質との結合表面積が小さく特異性を出すのが困難、つまり副作用障害を引き起こす可能性が高いという問題点も持っている。こうした低分子医薬品とは対照的に、近年バイオベンチャー企業等が中心となって、ホルモンや抗体等のタンパク質そのものを薬剤として製品化する動きが活発になっている。これらタンパク質製剤は、標的タンパク質に高い特異性で結合し、副作用が少ないため有機低分子化合物に代わる薬剤として期待されている反面、高コストや免疫原性の問題、標的が細胞外か細胞表面に限られるといった、乗り越えなければならない課題をまだ多く含んでいる。

有機低分子化合物とタンパク質の中間的な性質を持つ物質の一つとしてペプチドがある。ペプチドを薬剤として利用しようとする試み（ペプチド創薬）は、決して新しいものではなく、50年以上の歴史を誇る。しかし、細胞膜透過性の問題や、生体内安定性が低いことから、多くの薬剤を世の中に送り出すには至っていない。現在実用化されているペプチド医薬品の構造を見てみると、タンパク質合成に使われる20種類のアミノ酸（タンパク質性アミノ酸）以外のアミノ酸（非タンパク質性アミノ酸）を含んでいる「特殊ペプチド」であることがほとんどである。特殊ペプチドは、その特殊な化学構造のおかげで、天然のペプチドよりも生体内安定性が高く、標的への親和性も高いためにその

東京大学大学院理学系研究科（〒153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1）

Ribosomal synthesis of nonstandard cyclic peptides and its application to drug discovery

Gosuke Hayashi, Yukinori Ohshiro, and Hiroaki Suga
(Bioorganic Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

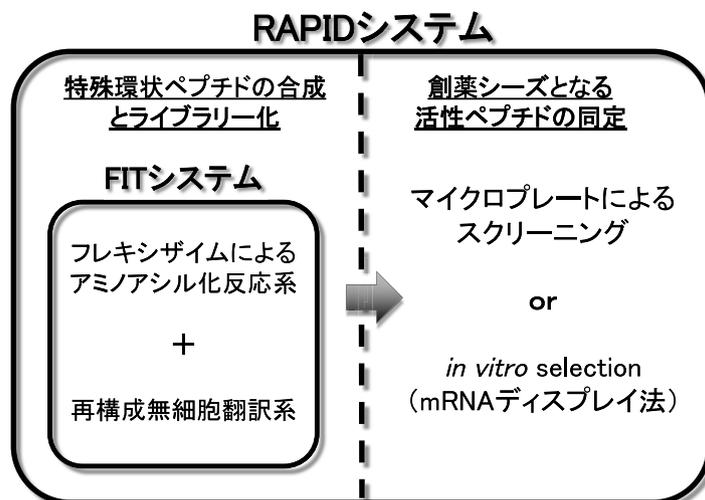


図1 RAPID システムの概要

高い薬効を有していると考えられる。さらに、そのような特殊ペプチドの中には、ペプチドの主鎖、あるいは側鎖が生理条件下で安定な分子内共有結合で環状化した骨格が多く見られる。従って、このような「特殊環状ペプチド」は、これからのペプチド創薬研究の主役になる可能性を秘めていると言えよう。こういった点において、特殊環状ペプチドのライブラリーを構築し、薬剤ターゲットとなるタンパク質の阻害剤、あるいは活性化剤を探索することは非常に意義深い。しかし、天然由来の化合物を抽出する方法や、化学合成を用いる方法では、十分なライブラリーの多様性を確保することは困難である。最近我々は、この問題を解決するために、RAPID (random peptide integrated discovery) システムの開発に成功した(図1)。RAPID システムとは、特殊環状ペプチドの合成に特化した人工翻訳合成系、flexible *in vitro* translation システム (FIT システム) と、翻訳系の特性を活かしたスクリーニング系や分子進化工学的手法とを組み合わせることで、多様性の高い特殊環状ペプチドライブラリーの構築とそのライブラリーからの活性ペプチドの同定を可能にする実験系のことである。現在までに我々は、RAPID システムを用いることで、標的タンパク質に対して高い結合能を持つ複数の特殊環状ペプチドの取得に成功している。本稿では、FIT システムで土台となる「遺伝暗号のリプログラミング」という概念と、その基盤技術である人工アミノアシル化リボザイム「フレキシザイム」について概説する。また、実際にRAPID システムを利用した創薬シーズ探索技術についても紹介する。

2. 薬剤候補として期待の高い特殊環状ペプチドをライブラリー化するために

現在、実際に医療現場で活躍している最も有名な特殊環状ペプチド薬剤の一つにシクロスポリンがある(図2a)。

真菌から単離されたシクロスポリンは、免疫抑制剤として機能する特殊環状ペプチドであり、アトピー性皮膚炎の治療などに使用されている。細胞内で標的であるシクロフィリンと結合して複合体を形成した後、シクロスポリンは、免疫反応の中核を担うホスファターゼ、カルシニューリンと結合する。これにより、カルシニューリンの酵素活性が阻害され、結果的にサイトカインの産生が抑制され免疫反応が抑制される。シクロスポリンの化学構造中には、薬剤としての機能を安定して発揮するための仕掛けがいくつも隠されている。それは、①ペプチド骨格の主鎖を形成するアミド結合の窒素の多くがメチル化されていること、②タンパク質性アミノ酸とは異なる立体構造(D-アミノ酸)や側鎖を持った非タンパク質性アミノ酸を含有すること、③環状構造を有していること、である。これらの構造的特徴が、シクロスポリンの細胞膜透過性や生体内のプロテアーゼに対する耐性、さらには標的タンパク質への高い親和性を付与していると考えられる。

また、特殊環状ペプチド薬剤として最も種類が豊富なのが抗生物質である。その代表的な化合物としてポリミキシン(図2b)やダプトマイシン(図2c)がある。これらも、シクロスポリン同様、天然から単離された化合物である。ポリミキシンとダプトマイシンは、それぞれグラム陰性細菌とグラム陽性細菌の細胞膜を破壊することで抗菌作用を示す。これら特殊環状ペプチドである抗生物質のほとんどは、共通した化学構造として、上記の②、③の性質を持っている。つまり、D-アミノ酸や側鎖が特殊な非タンパク質性アミノ酸を含有し、かつ主鎖あるいは側鎖が共有結合でつながった環状構造を有している。

それでは一体、生物はこれらの特殊環状ペプチドをどのように合成しているのだろうか。実際これらの特殊ペプチド群の生合成は、タンパク質が合成される翻訳系とは異なる

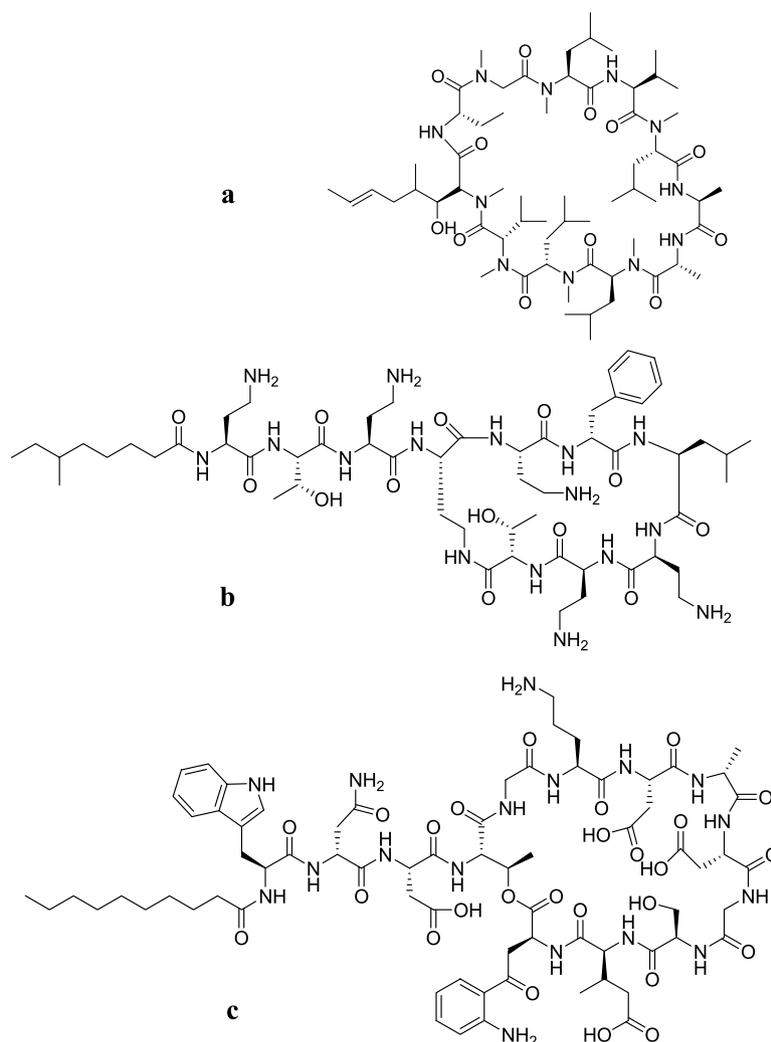


図2 天然由来の特殊環状ペプチド
a) シクロスポリン, b) ポリミキシン, c) ダプトマイシン

る触媒系で行われ、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS: non-ribosomal peptide synthetase) と呼ばれる複合モジュール性の酵素群がその重合反応を担っている¹⁾。この合成系は、翻訳系のように鋳型依存的な重合反応ではなく、規則正しく並んだ酵素内のモジュール (開始モジュール、伸長モジュール、終結モジュール) が順番に基質を反応させては隣に受け渡す、という作業を繰り返すことでペプチドの重合反応を行う。これらの酵素は、それぞれが特定のペプチドしか合成することができないため、多様な配列を持ったペプチドライブラリーを作製して薬剤スクリーニングを行うには不向きである。NRPSを人工的に改変して新たな基質特異性を持った酵素を作製するという試みも行われているが、実用的なライブラリーを作製するほどの酵素を得るには膨大な時間とコストが必要になり、現在までのところ現実的な方法ではない。

特殊環状ペプチドライブラリーを作製する現実的な方法

の一つとして、ペプチド固相合成法を基盤とした有機化学的手法がある。この方法では、従来のペプチド固相合成法に split and pool 法²⁾と呼ばれる概念を導入することでライブラリーを作製する。別々のアミノ酸 (例えば 20 種類) が固定化された樹脂ビーズを用意し、ひとまとめに混合する。その後、その樹脂ビーズを等分 (例えば 20 等分) し、それぞれに異なる 20 種類のアミノ酸をカップリングさせる。個別に反応させた樹脂ビーズを再びひとまとめに混合した後、再び等分し、異なるアミノ酸をカップリングさせる、という操作を何度も繰り返すことで、最終的に各樹脂ビーズ上に異なるペプチド配列が固定化されたペプチドライブラリー (単一の樹脂ビーズに単一のペプチド配列) ができあがる。この方法の問題点として、ライブラリーの多様性が樹脂ビーズの個数に限られるため、実験スケールを考えると、高い多様性の確保は難しい (約 10^6 種類)。

一方、リボソームによるポリペプチド合成系である翻訳

系は、ペプチドライブラリーを構築する上で有利な性質を持っている。翻訳系では、4種類の塩基 (U, C, A, G) の並びからなる mRNA を鋳型としてペプチド重合反応が行われる。その速度は速く、1秒間に40アミノ酸を重合することができる。また、間違っただけのアミノ酸をつなげる確率は1万分の1と言われている。mRNAの配列は、コドンと呼ばれる3つの塩基配列ごとに一つのアミノ酸をコードしており、各コドンとアミノ酸の対応関係は遺伝暗号と呼ばれる。つまり、翻訳系では mRNA の配列を変えるだけで異なる配列のペプチドを合成することができるのである。現在の分子生物学の技術を用いれば、ランダム配列を持つ mRNA の調製はたやすい。つまり、翻訳系を利用することで、簡便に多様性の高いペプチドライブラリーを構築することができる (約 10^{13} 種類)。さらに、mRNA は、逆転写反応とそれに続く PCR による増幅およびクローニングによる配列決定が可能であるため、ペプチドライブラリーからの活性種の同定や、PCR で増幅した DNA を用いて再合成も簡単に行えるというメリットもある。

上述したような翻訳系の長所を活かせば、多様性の高い特殊環状ペプチドライブラリーの作製が可能ではある。しかし、天然の翻訳系をそのまま用いるだけでは、合成できるペプチドが20種類のタンパク質性アミノ酸に限られてしまい、特殊環状ペプチドを構成する非タンパク質性アミノ酸を重合することができない。また、生理条件下で安定な環状構造を有するペプチドの合成も困難である。一方で FIT システムには、これらの問題を解決し、特殊環状ペプチドの翻訳合成を可能にするためのエッセンスが含まれている。それが、「遺伝暗号のリプログラミング」という概念である。

3. コドンテーブルを書き換えるという概念 ～遺伝暗号のリプログラミング～

遺伝暗号のリプログラミングとはどのようなものか。これを説明する前に、もう少し翻訳反応のメカニズムについて言及する。リボソームは、mRNA を鋳型として、その配列情報をコドンテーブル (図 3a) と呼ばれる遺伝暗号の対応関係を示した表に従って、アミノ酸へと変換する。この変換作業は、tRNA によって仲介されている。まず、tRNA は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) により、その3'末端にアミノ酸が連結されて (アミノアシル化) アミノアシル tRNA になる。ARS は、基質とするアミノ酸ごとに別々のタンパク質として存在し、特定の tRNA に特定のアミノ酸を連結する機能を持つ。例えば、アラニンをアミノアシル化する ARS (アラニル RS) は、5'-UGC-3' というアンチコドン配列 (tRNA の配列の一部で mRNA と相互作用する配列) を持つ tRNA を認識してアラニンを連結する。細胞内ではこのアミノアシル化反応が20種類のタ

ンパク質性アミノ酸に対して同時に起こっており、細胞内は多様なアミノアシル tRNA を同時に保持していることになる。次に、アミノアシル tRNA は、リボソーム内でそのアンチコドン配列を mRNA のコドン配列と塩基対形成させることで、mRNA の配列情報をアミノ酸へと変換する。

天然のコドンテーブルでは、20種類のタンパク質性アミノ酸のみが各コドンに対応づけられている (図 3a)。この対応関係は、ほぼ全ての生物で保存されており、通常変更することはできない。「遺伝暗号のリプログラミング」とはこの対応関係を人工的に改変してしまおうという概念である³⁾。もし、天然のタンパク質性アミノ酸の代わりに、望みの非タンパク質性アミノ酸に対応づけることができたなら、リボソーム合成によって非タンパク質性アミノ酸を含有した特殊ペプチドの合成が可能になるはずである。

FIT システムではこの「遺伝暗号のリプログラミング」を最大限に活用している。FIT システムは、我々の研究室で開発されたフレキシザイム (詳細は後述) によるアミノアシル化反応系と、大腸菌由来の再構成無細胞翻訳系^{4,5)} から構成される (図 1)。再構成無細胞翻訳系とは、大腸菌の持つ翻訳系を試験管内で再現したもので、リボソームや tRNA、ARS など翻訳に関わる因子をそれぞれ単離・精製し、再び一つに混ぜ合わせた翻訳系である。従来の無細胞翻訳系は細胞抽出液をそのまま用いるが、再構成系は、任意の構成因子 (アミノ酸や ARS 等) を翻訳系から自由に取り除くことができるという点で抽出系とは一線を画す。この特徴が「遺伝暗号のリプログラミング」を可能にするのだが、例えば、3種類のアミノ酸、メチオニン、ロイシン、トリプトファンを除いた翻訳系を考えてみる。この系では、これらのアミノ酸が存在しないので、対応するアミノアシル tRNA も合成されない。その結果、除かれたアミノ酸に対応するコドンに何も対応していない状態、つまり空きコドンができる (図 3b)。FIT システムの最大の特徴は、フレキシザイムを用いて調製された非タンパク質性アミノ酸が結合したアミノアシル tRNA (空きコドンに対応したアンチコドン配列を有する) を系中に加えることで、空きコドンが導入した非タンパク質性アミノ酸に対応するようになり、遺伝暗号の対応関係が非タンパク質性アミノ酸をコードするように書き換えることができるということである。また、必要に合わせ特定のタンパク質因子を加えなかったり、新たにペプチドを修飾する酵素を加えたりすることで、自由に翻訳系自体の機能をコントロールすることもできる。このように、FIT システムを用いれば、あたかも遺伝暗号を書き換えたかのように mRNA 上のコドンとアミノ酸の対応関係を再構築することができる。つまり、望みの非タンパク質性アミノ酸が連結されたアミノアシル tRNA を用意すれば、翻訳系で特殊ペプチドを合成できるようになるのである。それでは、どうやって非タンパ

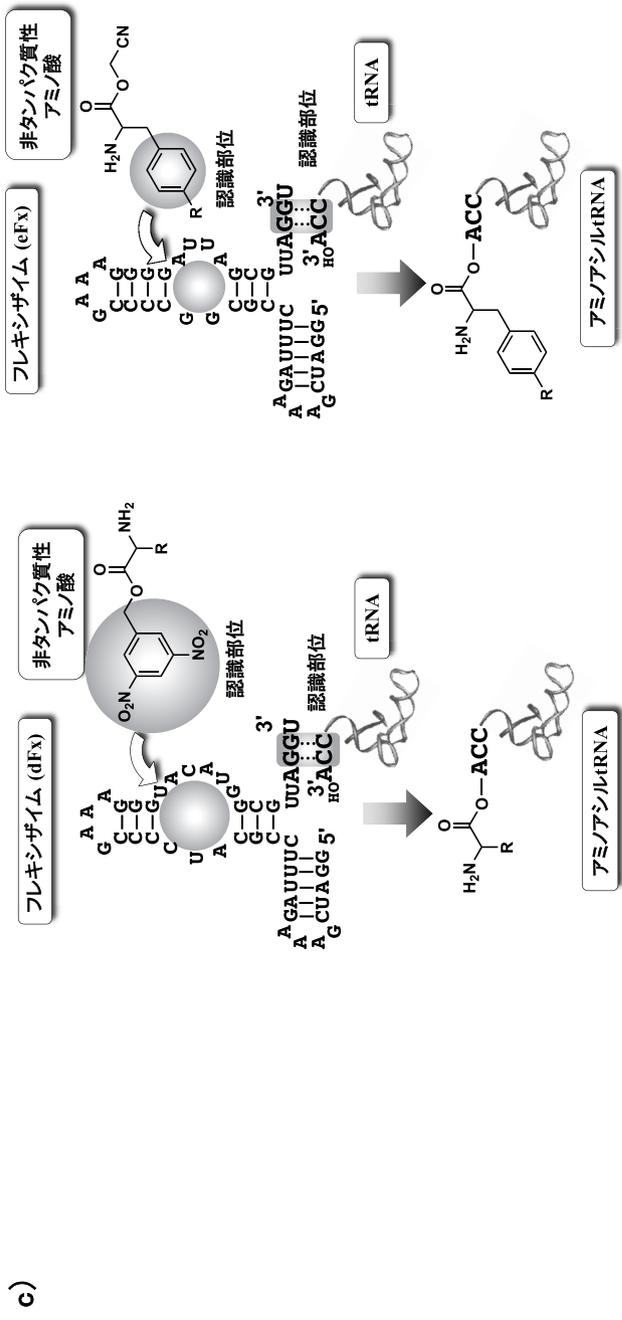
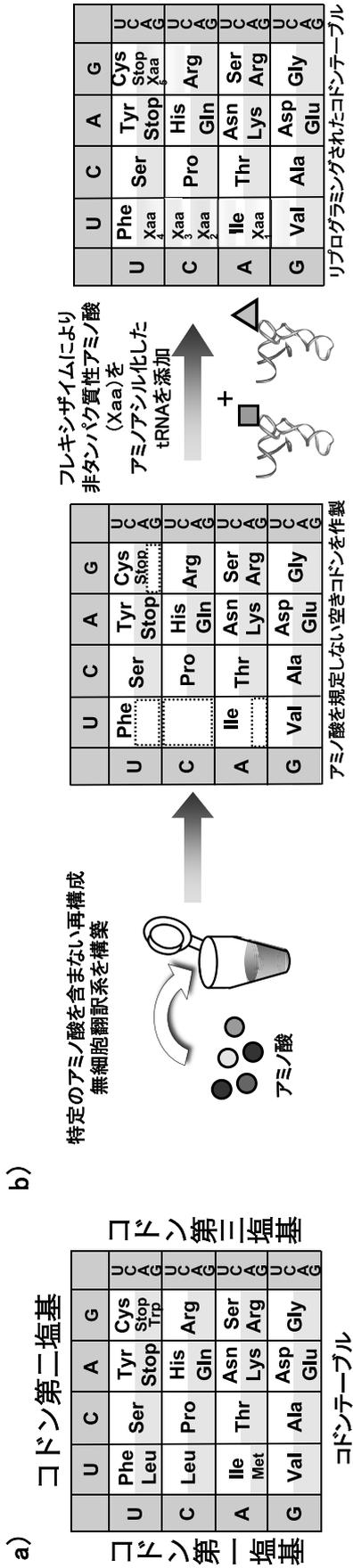


図3 特殊アミノ酸を導入する戦略
a) コドンテーパー, b) FIT システムによる遺伝暗号のリプログラミング, c) フレキシザイムによる tRNA のアミノアシル化

ク質性アミノ酸で tRNA をアミノアシル化するのだろうか。これを可能にした技術が次で説明する「フレキシザイム」である。

4. あらゆるアミノ酸で tRNA を自在にアミノアシル化する人工リボザイム～フレキシザイム～

目的のアミノ酸(タンパク質性あるいは非タンパク質性)を目的の tRNA に連結する従来までの方法は、大きく分けて二つあった。一つ目は、ARS を使う方法である。天然に存在する ARS は、上述のようにそれぞれ基質となるアミノ酸が決まっており、それ以外のアミノ酸をアミノアシル化する能力は基本的にない。しかし、いくつかの ARS は、基質アミノ酸と類似構造を持つアミノ酸に対して、高くはないがアミノアシル化を進行させる能力を有する。いわば ARS のミスアミノアシル化という現象を利用して非タンパク質性アミノ酸を導入したアミノアシル tRNA の合成が行われている^{6,7)}。しかし、この方法ではアミノアシル化できないアミノ酸が多数存在し、汎用性の高い方法とはいえない。ARS に分子進化学的手法を適用して改変し、その基質特異性を変化させる研究もあるが、この方法はアミノ酸と tRNA の組み合わせを変えるたびに、新しく ARS を取得しなければならないため、多大な労力を必要とする。そのため、多種類の非タンパク質性アミノ酸を簡便にアミノアシルするという点で不利な方法である^{8,9)}。

もう一つは、合成化学的手法を駆使したものである。この方法は、原則的にアミノ酸の構造に制限がなく、多種多様なアミノアシル tRNA を合成することができる^{10,11)}。しかし、tRNA の 3'末端のヌクレオチドであるアデノシンの誘導体を、調製したいアミノ酸ごとに化学合成する必要があるため、多段階の煩雑な操作を必要とし、アミノアシル tRNA の調製に大きな労力がかかってしまう。我々が目標とする特殊環状ペプチドは、多種多様な非タンパク質性アミノ酸を含んでいるため、ライブラリー構築を考えると、より簡便に多様なアミノアシル tRNA の調製を可能にする方法が必要になってくる。

この問題を解決したのが、我々の研究室で開発された人工アミノアシル化 RNA 触媒(リボザイム)、「フレキシザイム」である。我々の研究室では、10年以上前から様々な機能を持つ人工リボザイムの探索を行っており、これまでに、アミノアシル化リボザイムの他に、酸化リボザイム¹²⁾の取得に成功している。2001年に初めて分子進化学的手法を駆使して取得されたアミノアシル化リボザイムは¹³⁾、その後の改良を経て、現在では多種多様なアミノ酸を任意の tRNA にアミノアシル化することのできる2種類のリボザイム、ジニトロフレキシザイム(dFx)とエンハンストフレキシザイム(eFx)に進化している^{14,15)}。これらのフレキシザイムは、アミノ酸のカルボキシル基がそれぞ

れ3,5-ジニトロベンジルエステル基、あるいはシアノメチルエステル基として活性化されたものを基質として、tRNA の 3'末端をアミノアシル化することができる(図3c)。これは、天然のARSがATPで活性化されたアミノ酸を基質としてアミノアシル化するという性質に近いものがある。アミノアシル化反応の際、dFxは活性化アミノ酸のジニトロベンジル部位を認識し、eFxは側鎖の芳香環を認識する。dFxは脱離基となる部位を認識しているため、基本的に側鎖の構造に制限がなく、あらゆるアミノ酸をアミノアシル化することができる。ただし、側鎖に芳香環を有するアミノ酸の場合には、より活性度の高いシアノメチルエステル化体を基質とできるeFxを用いることが多い。また、これらのフレキシザイム反応では、3'末端に位置するGG配列がtRNAの共通3'末端配列であるCCA-3'のCCを認識することで、アミノアシル化反応が行われる¹⁶⁾(図3c)。このように、フレキシザイムは、tRNAの内部配列やアンチコドン配列を認識しないという点でARSとは大きく異なっている。そのため、様々な内部配列やアンチコドン配列を持つtRNAに対しても、dFxあるいはeFxでアミノアシル化することが可能である。さらに、これらのフレキシザイムはアミノ酸の α 位のアミノ基を認識していないので、N-メチルアミノ酸や α -ヒドロキシ酸、 β -アミノ酸等もアミノアシル化することができる。ここで述べたフレキシザイムによるアミノアシル化技術は、化学合成法に引けを取らないほど多様なアミノアシル tRNA を、ARS法と同様の簡便性で調製できる技術と言えよう。

ここで述べたフレキシザイムによるアミノアシル tRNA 合成系と、再構成無細胞翻訳系を統合したFITシステムを用いることで、多様な非タンパク質性アミノ酸をコドンテーブルに割り当てることができる。その結果、次項で紹介する多様な骨格を持つ特殊ペプチドや特殊環状ペプチドの翻訳合成が可能になったのである。

5. これまでに翻訳合成された特殊環状ペプチド

これまでに我々の研究室では、様々な特殊ペプチドの翻訳合成に成功している。その代表的なものとして、主鎖のアミド窒素がメチル化されたN-メチルペプチド¹⁷⁾や主鎖が α -ヒドロキシ酸のエステル結合でつながったペプチド(ポリエステル)¹⁸⁾、N末端に多様なアシル基を持つペプチド¹⁹⁾等があるが、ここでは「環状構造」というキーワードでこれまでの研究を紹介していきたい。現在ペプチド薬剤として活躍するものの多くは、安定な環状構造を有する特殊環状ペプチドであるということは既に述べた。一般的に、環状構造を持つ化合物は、直鎖状のものに比べ分子の動きが制限されるため、剛直であり標的タンパク質との強い相互作用を獲得しやすいと考えられている²⁰⁾。また、生体内のプロテアーゼに切断されにくく、生体内安定性を獲得しや

すいという性質も持っている。さらには、ペプチドを環状化することで膜透過性を獲得し、細胞内のタンパク質に作用するという報告例もある²¹⁾。我々は、このように薬剤としての長所を多く持つ特殊環状ペプチドの翻訳合成法を複数開発してきた。そこにはどのような戦略が存在するのか。ここでは代表的な三つの例を挙げて説明する。

一つ目は、クロロアセチル基とシステインのチオール基の S_N2 反応を利用した環状ペプチド形成法である (図 4a)¹⁹⁾。この反応によって生成するチオエーテル結合は、天然のペプチドやタンパク質中でよく見られるシステイン残基間のジスルフィド結合に比べて、細胞内の還元条件下で安定である。この反応を進行させるには、クロロアセチル基を含んだペプチドを合成する必要があるが、それを可能にしたのが、既に述べた FIT システムである。つまり、フレキシザイムを用いてクロロアセチル基を有するアミノ酸 (例えば *N*-クロロアセチルジアミノ酪酸) を tRNA にアミノアシル化した後、空きコドンを持った再構成無細胞翻訳系で翻訳合成することで、クロロアセチル基を含有したペプチドが合成される。また、この環化反応は、試薬の添加なしで進行する自発的な反応であるため、合成されたペプチドは翻訳反応系中で環化し、翻訳産物として直接環状ペプチドを得ることができる。さらに我々は、この環化技術と *N*-メチルアミノ酸導入技術を組み合わせて、環状 *N*-メチルペプチドの翻訳合成にも成功している¹⁷⁾。

二つ目は、アジド基とアルキニル基間の Huisgen 反応を利用した環状ペプチドの合成技術である (図 4b)²²⁾。この場合、アジド基を有するアミノ酸 (アジドホモアラニン) とアルキニル基を有するアミノ酸 (プロパルギルグリシン) とをアミノアシル化する必要がある。フレキシザイムで調製したこれら 2 種類のアミノアシル tRNA を含む無細胞翻訳系で翻訳されたペプチドに、一価の銅イオンを作用させることで、二つの官能基が反応してトリアゾール環が形成され、結果として環状ペプチドが生成する。この二つの官能基は、この条件下ではどのタンパク質性アミノ酸とも反応しないので、目的の位置で選択的に環状構造を作ることができる。また我々は、上述のクロロアセチル-システイン法と組み合わせることで、2 環構造を有するペプチドの翻訳合成にも成功している²²⁾。生理活性を持つペプチドの中には、分子内に複数の環を有するものが多数存在することを考えると、このような二環性特殊ペプチドの翻訳合成が達成されたことは、意義深いことであろう。

三つ目の方法論は、ペプチドの主鎖環化を可能にするものである。上で述べた二つの方法は、どちらも側鎖の官能基同士の反応によるものであった。しかし、天然の生理活性ペプチドの中には、主鎖の末端同士が結合し、環状化することで機能を発揮する化合物が多数存在する。この主鎖環化したペプチドの翻訳合成は「システイン-プロリン-グリコール酸」という連続配列を含むペプチドを発現するこ

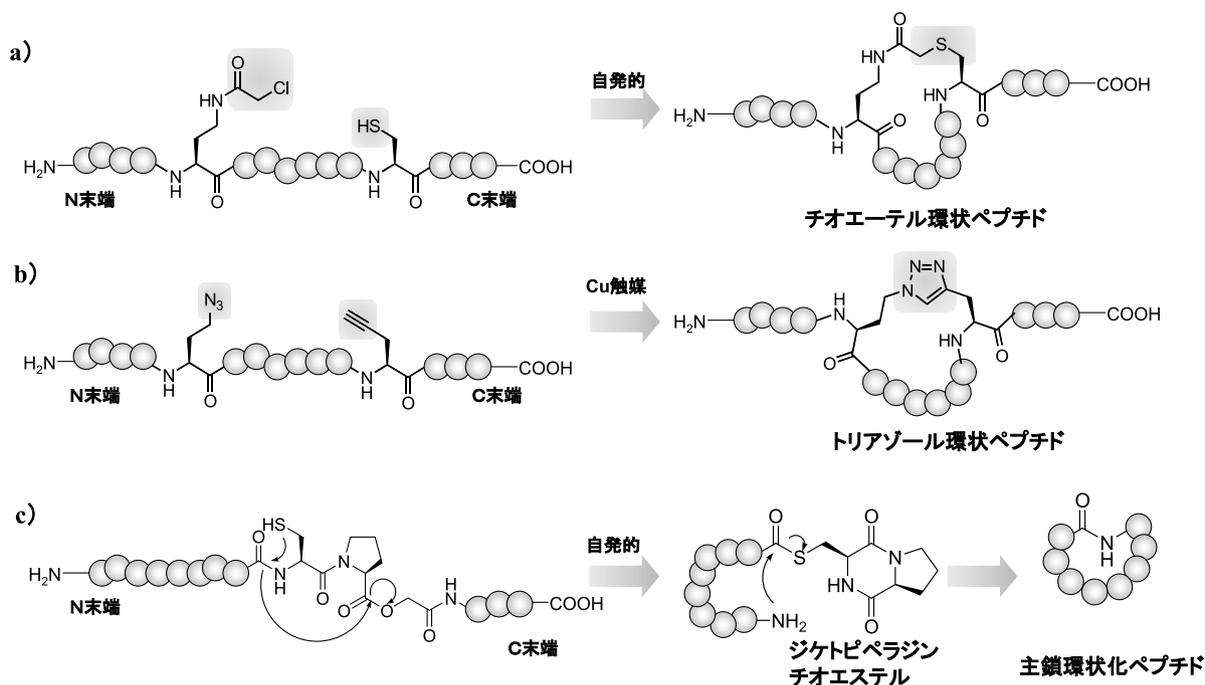


図 4 特殊環状化ペプチド

- クロロアセチル基とシステインとの環化
- アジド基とアルキニル基との環化
- グリコール酸の脱離とジケトピペラジン中間体を介した主鎖環化

とで可能になる (図 4c). この配列は, プロリン-グリコール酸間のエステル結合の開裂を伴うジケトピペラジン骨格の形成をドライビングフォースとして, 自発的にチオエステルを形成する²³⁾. その後, N 末端のアミノ基が C 末端に形成されたチオエステルを求核攻撃して環状化することで, 主鎖同士が繋がった環状ペプチドが生成する. α -ヒドロキシ酸は, 上述した α -ヒドロキシ酸の重合によるポリエステルの翻訳合成法を利用することで導入した¹⁸⁾. また, 通常の翻訳反応では開始コドンがメチオニンに限られるため, 環化反応後の配列が「メチオニン-任意のアミノ酸」という制限があるが, FIT システムを用いれば, メチオニン以外のアミノ酸で翻訳を開始することができるため¹⁹⁾, 任意のアミノ酸残基同士で主鎖環化したペプチドを合成することができる. また, この問題は, N 末端のメチオニンを選択的に除去する酵素 MAP (methionine aminopeptidase) を用いることでも解決できる. この主鎖環化技術を利用して, 我々は複数の天然由来環状ペプチドの翻訳合成に成功している²⁴⁾.

ここで述べた 3 種類の方法以外にも, ビニルグリシン (翻訳導入後に熱異性化でデヒドロブチリンになり, マイケルアクセプターとして働く) とシステイン間のマイケル付加反応を利用した方法²⁵⁾や, ヒドロキシトリプトファンとベンジルアミン間の酸化カップリングを利用した方法²⁶⁾の開発にも成功している. このように現在我々の研究室では, 様々な構造を持つ特殊環状ペプチドの翻訳合成が可能になっており, 特殊環状ペプチドライブラリーを作製して, 創薬シーズとなる活性ペプチドの取得を目指して研究を進めている.

6. 特殊環状ペプチドライブラリーを用いた創薬シーズの探索

これまでに述べたように, FIT システムによって, フレキシザイムを利用した遺伝暗号のリプログラミングによって翻訳系で様々な特殊環状ペプチドの合成が可能になる. FIT システムのさらなる長所は, ランダム化された鋳型 mRNA を用いることで多種多様な構造・配列を持つ特殊環状ペプチドライブラリーの作製が可能であり, それを用いて活性ペプチドの探索が迅速に行えることである. 現在, 活性を持つ創薬シーズペプチドの探索法として, 我々は以下に示す 2 種類の方法を採用して研究を行っている (図 5).

一つ目の方法は, マイクロプレートを用いた活性スクリーニングである (図 5a). まず, ランダム配列を有する鋳型 DNA (DNA ライブラリー) を調製し, 翻訳用マイクロプレートの各ウェルに分配する. 次に, リプログラミングされた遺伝暗号を持つ FIT システムを用いて, 各ウェル中の DNA を転写・翻訳することで, 特殊環状ペプチドラ

イブラリーを作製する. 続いて, 各ウェルに標的タンパク質と, その活性あるいは結合をモニターするための試薬を加えて, プレートリーダー等で活性ペプチドが含まれるウェルをスクリーニングする. 活性を示したウェルに含まれるペプチドに対応する DNA を新たなプレートに再分配し, 同様の操作を行う. この操作を繰り返すことで, 1 ウェルあたりに含まれる DNA の種類, つまり翻訳されるペプチドの種類が減り, 最終的に 1 種類のペプチドに絞られる. 単離されたペプチドの配列は, DNA の配列を決定しリプログラミングされたコドンテーブルと照らし合わせることで, 簡単に決定することができる. このように, 転写・翻訳系と通常のスクリーニング法を組み合わせることで, ライブラリーの構築と, 活性ペプチドの単離・同定を非常に簡便に行うことができる. これが一つ目の手法の最大の強みである. 我々はこれまでに, ここに示した方法で, DNA ライブラリーから特殊環状ペプチドライブラリーが構築可能であるということを確認している¹⁹⁾. また, 実際に, 生理活性ペプチドを部分的にランダム化した特殊環状ペプチドライブラリーから, 新規の活性ペプチドの取得にも成功している²⁴⁾. この方法は, 生理活性に基づいた直接的な活性スクリーニングが可能である反面, 転写・翻訳等にかかるコストを考慮すると, ライブラリーの規模が数万程度に限られるという問題点がある. このライブラリー多様性の問題点を克服したのが次で説明する方法である.

二つ目の方法は, mRNA ディスプレイ法を用いる方法である. mRNA ディスプレイ法とは, ペプチドの試験管内分子進化法 (インビトロセクション法) であり, ペプチドとその鋳型である mRNA を共有結合で連結することで, ランダムペプチドライブラリーの中から活性ペプチドの単離・同定を可能にする技術である^{27,28)} (図 5b). この方法のキーポイントとなる鋳型 mRNA と翻訳されたペプチド間での共有結合形成は, ピューロマイシンという化合物が担っている. あらかじめ mRNA の 3' 末端に連結されたピューロマイシンは, 翻訳反応が進行しリボソームが mRNA の 3' 末端に近づいてくると, ペプチジル tRNA のエステル結合を求核攻撃して, 結果的にペプチド配列と連結されるのである. それぞれの鋳型 mRNA と連結されたペプチドライブラリーを, 標的タンパク質をあらかじめ固定化しておいた担体と混合し, 標的タンパク質に結合したペプチドのみを回収する. 続いて, 回収されたペプチドに連結されている mRNA を鋳型として, 逆転写反応・PCR を行うことで, 回収されたペプチドの配列情報を持った DNA を増幅する. この DNA を用いて再び転写から一連の操作を繰り返す. この操作の繰り返しにより, 初めはランダムであったペプチドライブラリーから, 次第に活性を有するペプチドが濃縮され, 最終的に活性を持つペプチド

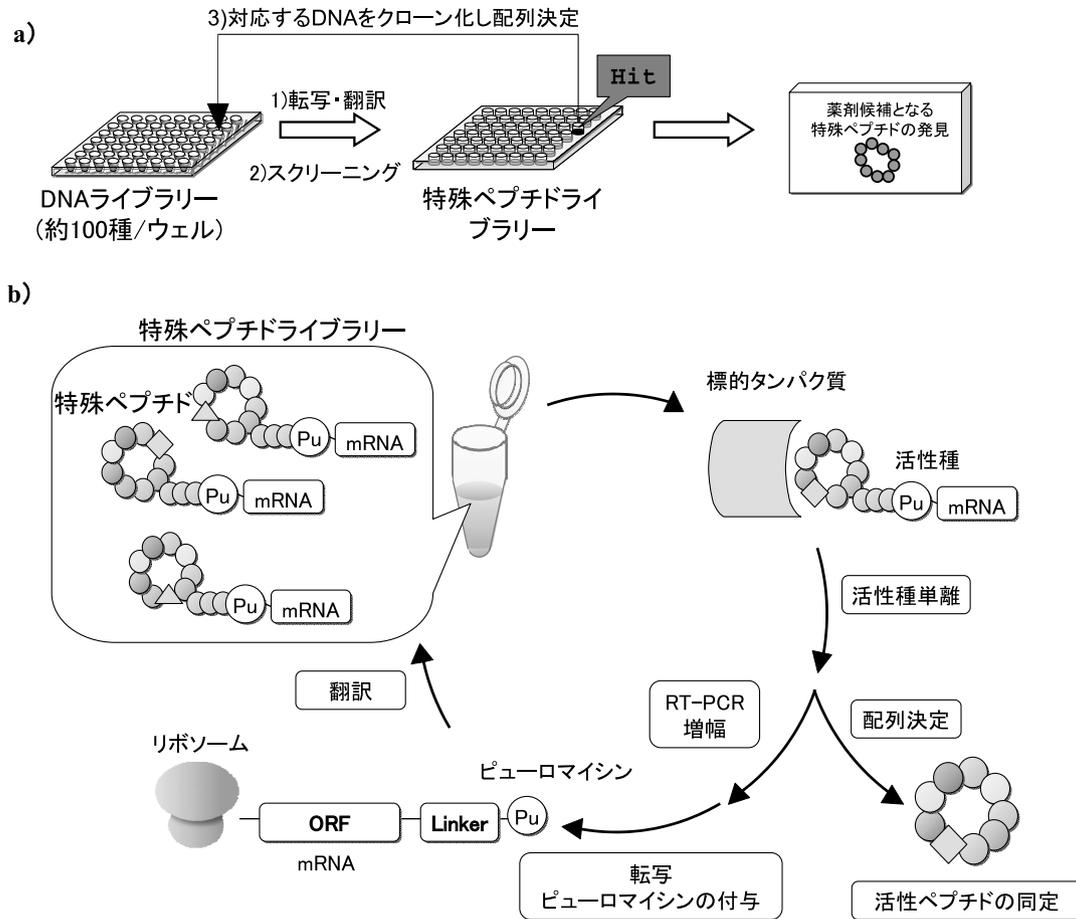


図5 RAPID システムによる活性ペプチドの探索
 a) スクリーニングによる活性ペプチドの探索
 b) mRNA ディスプレイ法による活性ペプチドの探索

だけを単離することができる。この翻訳反応の際に、望みの非タンパク質性アミノ酸を含むように書き換えられたコドンテーブルを持つFITシステムを用いることで、構築されるライブラリーが特殊環状ペプチドライブラリーとなる。このようにして、標的タンパク質に結合する活性特殊環状ペプチドの単離が可能となる。この方法では、1本のチューブの中で 10^{13} 程度の多様性を持つ特殊環状ペプチドライブラリーの作製が可能であり、前者の方法と比べて、圧倒的に多様性の高いライブラリーから活性ペプチドの探索が可能である。実際に我々の研究室では既にこの方法を用いて、複数の標的タンパク質に対して特異的に結合する特殊環状ペプチドの単離・同定に成功している。将来的には、取得した活性ペプチドを用いて、薬剤としての可能性の探索やケミカルバイオロジーへの展開を視野に入れて研究を進めている。また、活性ペプチドの取得をより高速に行うために、ロボットによるmRNAディスプレイの自動化にも着手している。

7. おわりに

ヒトの全塩基配列が解読され、ヒト遺伝子の数が約2万2千個であることがわかった今、それぞれの遺伝子にコードされるタンパク質が互いにどのように相互作用し、生命というシステムを創り出しているのか、という大きな課題に取り組むシステムバイオロジーという分野が盛んになっている。システムバイオロジーの発展によって、医学のあり方も修正を求められている。これまでの医学の基本的な考え方は、遺伝子疾患でも感染症でも、ある一つの原因を同定してその原因を取り除くというやり方であった。しかし、生命をシステムとしてとらえた場合、疾患は、そのシステムを構成する多因子ネットワークの故障であり、その治療はそのネットワークの修復ということになる。この多因子からなるネットワークを修復することで、疾患状態にある生命システムを通常状態のシステムへと導くのである。この、システムを転換するという作業は、一つの因子を抑えることで達成できる場合もあるが、多くの場合、複数の因子を同時に抑える必要があると考えられる。つま

り、疾患の治療には、単一の標的ではなく、複数の標的タンパク質を同時に狙い打つことが重要だという認識が浸透しつつあるのだ。これは例えば、分化した細胞からiPS細胞を作製（分化細胞からiPS細胞へのシステムの転換）する際に、複数の遺伝子あるいは化合物を同時に作用させなければならないことを考えるとわかりやすい。このように複数標的を同時に狙うとなれば、様々な標的タンパク質に特異的に結合して働く生理活性分子を、低コストかつハイスループットにスクリーニングする手法が必須である。本稿で述べたように、我々が開発したRAPIDシステムは、このニーズに応えることのできるバイオテクノロジーであると自負している。今後、この応用範囲の広い薬剤探索システムを駆使して、未来の薬剤開発をリードする分野で一隅を照らすことができれば幸いである。

文 献

- 1) Grunewald, J. & Marahiel, M.A. (2006) *Mol. Biol. Rev.*, **70**, 121-146.
- 2) Lam, K.S., Salmon, S.E., Hersh, E.M., Hruby, V.J., Kazmier-ski, W.M., & Knapp, R.J. (1991) *Nature*, **354**, 82-84.
- 3) Forster, A.C., Tan, Z., Nalam, M.N.L., Lin, H., Qu, H., & Cornish, V.W. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6353-6357.
- 4) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nature Biotechnol.*, **19**, 751-755.
- 5) Hsiang-Fu, K., Betty, R., Benjamin, V.T., Barnet, E., Carlos, S., & Herbert, W. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 6889-6894.
- 6) Hartman, M.C., Josephson, K., & Szostak, J.W. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4356-4361.
- 7) Hartman, M.C., Josephson, K., Lin, C.W., & Szostak, J.W. (2007) *PLoS ONE*, **2**, e972.
- 8) Wang, L. & Schultz, P.G. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 34-66.
- 9) Link, A.J. & Tirrell, D.A. (2005) *Methods*, **36**, 291-298.
- 10) Hecht, S.M., Alford, B.L., Kuroda, Y., & Kitano, S. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 4517-4520.
- 11) Robertson, S.A., Ellman, J.A., & Schultz, P.G. (1991) *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2722-2729.
- 12) Tsukiji, S., Pattnaik, S.B., & Suga, H. (2003) *Nature Struct. Biol.*, **10**, 713-717.
- 13) Saito, H., Kourouklis, D., & Suga, H. (2001) *EMBO. J.*, **20**, 1797-1806.
- 14) Murakami, H., Kourouklis, D., & Suga, H. (2003) *Chem. Biol.*, **10**, 1077-1084.
- 15) Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H., & Suga, H. (2006) *Nat. Methods*, **3**, 357-359.
- 16) Xiao, H., Murakami, H., Suga, H., & Ferre-D'Amare, A.R. (2008) *Nature*, **454**, 358-361.
- 17) Kawakami, T., Murakami, H., & Suga, H. (2008) *Chem. Biol.*, **15**, 32-42.
- 18) Ohta, A., Murakami, H., Higashimura, E., & Suga, H. (2007) *Chem. Biol.*, **14**, 1315-1322.
- 19) Goto, Y., Ohta, A., Sako, Y., Yamagishi, Y., Murakami, H., & Suga, H. (2008) *ACS Chem. Biol.*, **3**, 120-129.
- 20) Kim, Y.K., Arai, M.A., Arai, T., Lamenzo, J.O., Dean, III, E. F., Patterson, N., Clemons, P.A., & Schreiber, S.L. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14740-14745.
- 21) Walensky, L.D., Kung, A.L., Escher, I., Malia, T.J., Barbuto, S., Wright, R.D., Wagner, G., Verdine, G.L., & Korsmeyer, S. J. (2004) *Science*, **305**, 1466-1470.
- 22) Sako, Y., Morimoto, J., Murakami, H., & Suga, H. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7232-7234.
- 23) Kawakami, T. & Aimoto, S. (2007) *Chem. Lett.*, **36**, 76-77.
- 24) Kawakami, T., Ohta, A., Ohuchi, M., Ashigai, H., Murakami, H., & Suga, H. (2009) *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 888-890.
- 25) Goto, Y., Iwasaki, K., Torikai, K., Murakami, H., & Suga, H. (2009) *Chem. Comm.*, **23**, 3419-3421.
- 26) Yamagishi, Y., Ashigai, H., Goto, Y., Murakami, H., & Suga, H. (2009) *ChemBioChem*, **10**, 1469-1472.
- 27) Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., & Yanagawa, H. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 405-408.
- 28) Roberts, R.W. & Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 12297-12302.