

文部科学大臣賞

# コドンボックス人工分割法の開発

ーリボソーム翻訳における基質アミノ酸の種類拡大ー

東京大学大学院 理学系研究科 化学専攻  
博士課程二年

岩根 由彦

# 1. 緒言

生物の遺伝情報は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4塩基からなるDNA配列に刻まれている。この遺伝情報を発現する際(図1A)、DNAはmRNAへと転写され、mRNAはタンパク質合成の場であるリボソームに取り込まれる。その後リボソーム内で、mRNAの塩基配列に則してアミノ酸が重合され、ペプチドやタンパク質が生合成される。この反応はmRNAをポリペプチドへと変換する翻訳反応と呼ばれる。翻訳反応のルールとして、mRNA上の3ヌクレオチドが一単位(コドン)として認識され、各アミノ酸へと翻訳される(図1B)。mRNAはA、G、C、U(ウラシル)の4塩基により構成されるため、コドンは $4^3 = 64$ 種存在するが、それに対してアミノ酸は20種しか存在しない。すなわち複数のコドンが同じアミノ酸に翻訳されるという「冗長」な対応付けが存在する。この冗長な遺伝暗号はタンパク質合成の速度や正確性を適切に制御するために進化の過程で必要とされたと一般に解釈されている。しかし翻訳反応をポリペプチド合成のツールとして見たときには、構成要素が20種に限られることは制限でしかなく、この構成要素を大きく拡大することが望ましい。そこで本研究では、「翻訳反応は20種のアミノ酸を基質とする」という生物の常識を覆し、再構成試験管内翻訳系で利用出来るアミノ酸の種類を20種から理論上31種まで拡大できる新技術を開発することを目指した。実際に23種のアミノ酸からなるポリペプチド合成に成功しており[1]、翻訳反応の利用価値を大きく拡大する基盤技術が確立された。

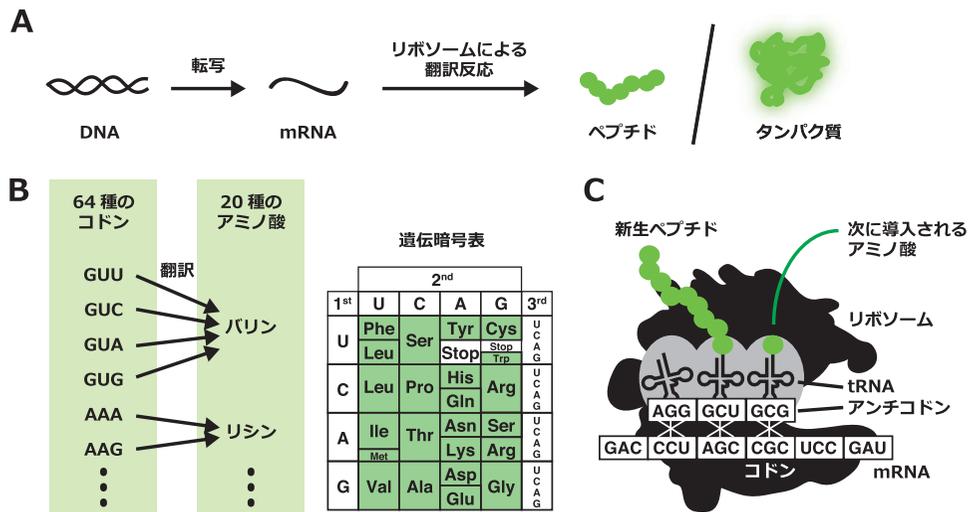


図1. 翻訳反応によるポリペプチド合成 (A) 遺伝情報が転写・翻訳されることで、ペプチドやタンパク質が合成される。(B) 翻訳の遺伝暗号は、複数のコドンをもつ同一のアミノ酸に変換するという冗長な対応付けである。(C) コドンとアミノ酸の対応付けは tRNA により規定される。

## 2. 戦略：コドンと tRNA の冗長な対応関係を解きほぐす

天然の翻訳系において、コドンとアミノ酸の対応付けは、tRNA によって規定されている (図1C)。バリンコドンボックスと呼ばれる4つのコドン (GUU、GUC、GUA、GUG) の翻訳を例にとり説明する (図2A)。これらのコドンはバリンを付加された2種の tRNA により解読される。GAC アンチコドンを持つ tRNA (tRNA<sup>Val</sup><sub>GAC</sub>) は GUU・GUC コドンを解読し、一方で cmo<sup>5</sup>UAC (cmo<sup>5</sup>U: uridine 5-oxyacetic acid) アンチコドンを持つ tRNA (tRNA<sup>Val</sup><sub>cmo<sup>5</sup>UAC</sub>) はその塩基修飾の影響により4つのコドンを全て解読する [2]。コドンと tRNA 間の複雑な対応関係は、遺伝暗号表全体に渡って存在する (図2D)。このように同一のアミノ酸が複数の tRNA へと付加され、さらにそれらの tRNA が複数のコドンを解読するという複雑かつ冗長な対応関係があるために、コドンは64種も存在するにも関わらず、翻訳後のアミノ酸は20種しか存在しないのである。この対応関係を作っているものは、天然に存在する tRNA (天然 tRNA) である。そこで本研究ではこの天然 tRNA を一切使用せず、代わりに人工的に設計し試験管内転写反応で調製した tRNA (転写 tRNA) を利用することで、「コドン-tRNA-アミノ酸」の対応付けをより単純なものへと解きほぐすことを狙った。この戦略について、先ほどのバリンコドンボックスを例にとり説明する。再構成試験管内翻訳系に加える tRNA として、天然 tRNA の代わりに、GAC アンチコドンを持つ転写 tRNA (tRNA<sub>GAC</sub>) と CAC アンチコドンを持つ転写 tRNA (tRNA<sub>CAC</sub>) を加える (図2B)。tRNA<sub>GAC</sub> と tRNA<sub>CAC</sub> はワトソン-クリック塩基対形成により、それぞれ GUC と GUG コドンを解読し、両者をバリンへと翻訳する。これにより、GUC コドンと GUG コドンを異なる2種の転写 tRNA により独立して読み分けられる。同様にして SNN アンチコドン (S=G, C; N=A, G, C, U) を持つ31種の転写 tRNA<sub>SNN</sub> を加えることで、遺伝暗号表に存在する31種の NNS コドンを単純な1対1対応で読み分けられると期待される (図2E)。この時、31種の転写 tRNA が20

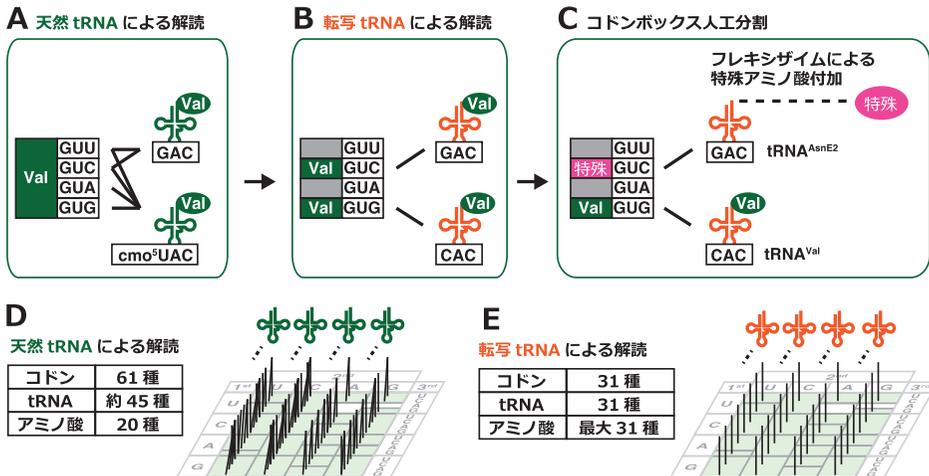


図2. コドンボックス人工分割の戦略 (A) 天然 tRNA によるバリンコドンボックスの解読。(B) 2種の転写 tRNA により GUC、GUG コドンを独立して読み分ける。(C) GUC コドンに特殊アミノ酸を対応づけることで、バリンに加えて特殊アミノ酸を翻訳基質に追加する。(D) 天然 tRNA による複雑かつ冗長な解読。(E) 転写 tRNA による単純な1対1対応の解読。

種のアミノ酸に対応しているため、転写 tRNA のうち11種は除いても構わない。例えば、tRNA<sup>Val</sup><sub>GAC</sub> を取り除いても、tRNA<sup>Val</sup><sub>CAC</sub> が残っていれば、バリンは遺伝暗号に残されている。ここへさらに、人工アミノアシル化リボザイム「フレキシザイム」により特殊アミノ酸を事前に付加した生体直交型 tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> を加えることで [3、4]、GUG コドンにバリンを残したまま、GUC コドンに新たに特殊アミノ酸を対応づけることができる (図2C)。「コドンボックス人工分割法」と名付けた本手法を遺伝暗号表全体に適応することで、理論上は20種の天然アミノ酸に加えて11種の特殊アミノ酸をリボソーム翻訳反応の基質として追加できる。以上が本戦略の理論的な説明であるが、この研究を実際に進めるためには、先行研究で観察されてきた二つの大きな問題を克服する必要があった。そこで次に、その二つの問題の内容と克服した方法について記述する。

### 3. 第一の関門：転写 tRNA による正確な翻訳の達成

本研究の独創的なアプローチは、天然 tRNA の代わりに転写 tRNA を利用したことにある。天然 tRNA と本研究の転写 tRNA の違いは2点存在する。1点目は、アンチコドンの一文字目を C または G に人工的に置換したこと。2点目は、天然 tRNA が cm<sup>5</sup>U や Ψ (シュードウリジン) のような修飾塩基を10個程度含むものに対して、転写 tRNA は修飾塩基を全く含まないということである。これらアンチコドン配列や修飾塩基の存在は、tRNA の三次元構造の形成やアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) による認識に重要であり、さらには翻訳の効率や正確性に影響することが先行研究により報告されてきた [5、6]。すなわち転写 tRNA は「機能不完全」な tRNA である可能性が高く、転写 tRNA を用いて31個のコドンを全て正確に翻訳するという事は非常に挑戦的な課題であった。この課題を克服した手法について記述する。本研究ではまず、3種の転写 tRNA (tRNA<sup>Lys</sup>、tRNA<sup>Ile</sup>、tRNA<sup>Glu</sup>) を最優先に取り組んだ。というのも、これらの tRNA は修飾塩基を欠損させてしまうと、各 aaRS によるアミノ酸付加の効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) が低下することが知られており、明らかに問題のある転写 tRNA だからである (図3) [5]。本研究では、この反応の基質である転写 tRNA の濃度を増やすことで、アミノ酸付加速度の低下を補うことを試みた。転写 tRNA<sup>Lys</sup> の結果を図4A に示す。この実験では転写 tRNA<sup>Lys</sup> を含む試験管内翻訳系により放射ラベル化ペプチドを合成し、

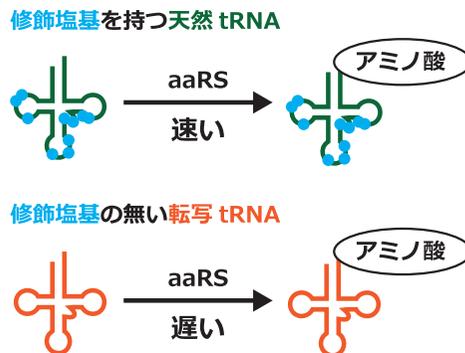


図3. 転写 tRNA を使用する懸念事項 一部の aaRS は修飾塩基を持つ天然 tRNA に効率よくアミノ酸を付加できる一方で、修飾塩基を持たない転写 tRNA には効率よく付加できない。

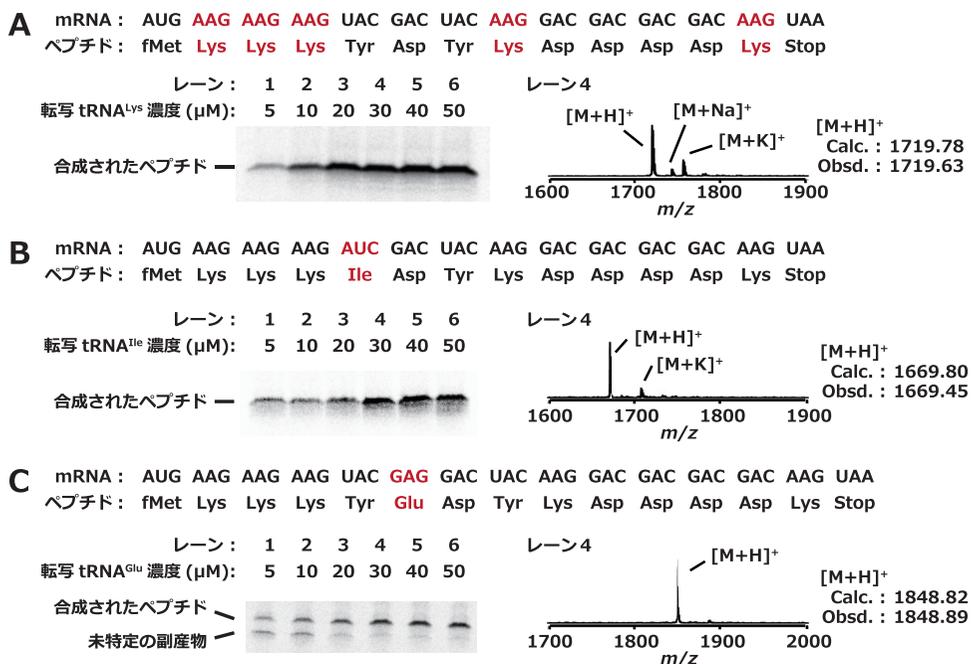
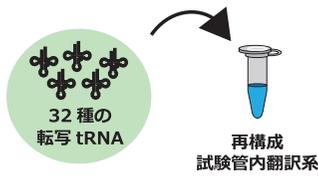


図4. 転写 tRNA の濃度最適化による、ペプチド合成の効率と正確性の改善 (A) 転写 tRNA<sup>Lys</sup> 濃度の最適化。ペプチド産物を tricine-SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィーと MALDI-TOF-MS により解析した。(B、C) 転写 tRNA<sup>Ile</sup> 濃度と転写 tRNA<sup>Glu</sup> 濃度の最適化実験。[1]

放射線量を測定することで合成効率の改善を確認した。実験の結果、tRNA<sup>Lys</sup> 濃度を 30μM まで増やすことでペプチド合成効率を改善できることが分かった。また 30μM の条件で合成されたペプチド産物を MALDI-TOF-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置) により解析することで、設計通りのペプチドが正確に合成されていることが確認された。転写 tRNA<sup>Ile</sup> と転写 tRNA<sup>Glu</sup> についても、同様に濃度を 30μM に増やすことで、高効率かつ正確な翻訳が達成された (図 4B、C)。その他 29 種の転写 tRNA についても濃度を最適化した後、32 種の転写 tRNA からなる翻訳系「32 転写 tRNA 翻訳系」を構築し (図 5A)、その正確性と効率の評価を行った。まず正確性の評価のため、16 種の NNG コドンを含む mRNA (図 5B) と 15 種の NNC コドンを含む mRNA (図 5C) をそれぞれ翻訳し、ペプチド産物を MALDI-TOF-MS により解析した。その結果、設計通りのペプチドが合成されていることが確認され、転写 tRNA により計 31 種の NNG コドンと NNC コドンを全て正確に翻訳できることが実証された。次に翻訳効率の評価のため、20 種の天然アミノ酸を全て含むペプチドの翻訳合成を評価した (図 5D)。その結果、やはり望みのペプチドが正確に合成されていることが確認され、またその合成効率は、天然 tRNA を加えたコントロールに対して 30% であった [1]。

A



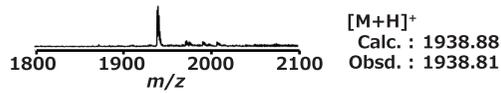
各転写 tRNA の最適濃度

		2 <sup>nd</sup>				3 <sup>rd</sup>
1 <sup>st</sup>		U	C	A	G	
U	tRNA <sup>Phe</sup> <sub>GAA</sub>	tRNA <sup>Ser</sup> <sub>GGA</sub>	tRNA <sup>Tyr</sup> <sub>GUA</sub>	tRNA <sup>Cys</sup> <sub>GCA</sub>	C	
	tRNA <sup>Leu</sup> <sub>CAA</sub>	tRNA <sup>Ser</sup> <sub>CGA</sub>		tRNA <sup>Trp</sup> <sub>CCA</sub>	G	
C	tRNA <sup>Leu</sup> <sub>GAG</sub>	tRNA <sup>Pro</sup> <sub>GGG</sub>	tRNA <sup>His</sup> <sub>GUG</sub>	tRNA <sup>Arg</sup> <sub>GCG</sub>	C	
	tRNA <sup>Leu</sup> <sub>CAG</sub>	tRNA <sup>Pro</sup> <sub>CGG</sub>	tRNA <sup>Gln</sup> <sub>CUG</sub>	tRNA <sup>Arg</sup> <sub>CCG</sub>	G	
A	tRNA <sup>Ile</sup> <sub>GAU</sub>	tRNA <sup>Thr</sup> <sub>GGU</sub>	tRNA <sup>Asn</sup> <sub>GUU</sub>	tRNA <sup>Ser</sup> <sub>GCU</sub>	C	
	tRNA <sup>Met</sup> <sub>CAU</sub>	tRNA <sup>Thr</sup> <sub>CGU</sub>	tRNA <sup>Lys</sup> <sub>CUU</sub>	tRNA <sup>Arg</sup> <sub>CCU</sub>	G	
G	tRNA <sup>Val</sup> <sub>GAC</sub>	tRNA <sup>Ala</sup> <sub>GGC</sub>	tRNA <sup>Asp</sup> <sub>GUC</sub>	tRNA <sup>Gly</sup> <sub>GCC</sub>	C	
	tRNA <sup>Val</sup> <sub>CAC</sub>	tRNA <sup>Ala</sup> <sub>CGC</sub>	tRNA <sup>Glu</sup> <sub>CUC</sub>	tRNA <sup>Gly</sup> <sub>CCC</sub>	G	
	tRNA <sup>Ini</sup> <sub>CAU</sub>					

1  $\mu$ M  
 5  $\mu$ M  
 30  $\mu$ M

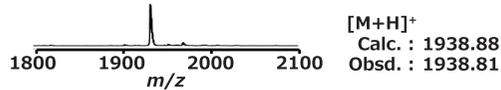
B

mRNA : AUG UUC UCC UAC UGC CUC CCC CAC CGC AUC ACC AAC AGC GUC GCC GAC GAC UAA  
 ペプチド: fMet Phe Ser Tyr Cys Leu Pro His Arg Ile Thr Asn Ser Val Ala Asp Gly Stop



C

mRNA : AUG UUG UCG UGG CUG CCG CAG CGG AUG ACG AAG AGG GUG GCG GAG GAG UAA  
 ペプチド: fMet Leu Ser Trp Leu Pro Gln Arg Met Thr Lys Arg Val Ala Glu Gly Stop



D

mRNA : AUG AAG AAG AAG CAG CGG UCG AUG GGC CUC CCG CGC UGG ACC GCC GAG AAC →  
 ペプチド: fMet Lys Lys Lys Gln Arg Ser Met Gly Leu Pro Arg Trp Thr Ala Glu Asn →  
 → GUC CAC AUC GGG GUG UUC UGC GAC UAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG UAA  
 → Val His Ile Gly Val Phe Cys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Stop

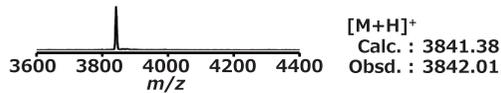


図5. 「32転写 tRNA 翻訳系」による全 NNS コドンの正確な翻訳 (A) 最適濃度の32種転写 tRNA を再構成試験管内翻訳系に加えることで、全 NNS コドンを読み解ける「32転写 tRNA 翻訳系」を構築した。(B、C) それぞれ16NNC コドンと15NNG コドンを含む mRNA を翻訳し、ペプチド産物を MALDI-TOF-MS で解析した。(D) 20種の天然アミノ酸を全て含むペプチドを翻訳合成した。[1]

#### 4. 第二の関門：人工分割したコドンボックスの正確な読み分けの達成

次にバリンコドンボックスを人工分割し、バリンに加えてN-メチルチロシン ( $MeY$ )を追加することを試みた。この戦略の難点は、Val-tRNA が翻訳系中の aaRS により絶えず合成され補充されるのに対して、事前に合成した上で加える  $MeY$ -tRNA は徐々に消費され濃度が減少していくという点である。このように GUG コドンと GUC コドンに対応する2種のアミノアシル tRNA の条件が大きく異なるため、そのバランスを整える必要があった。実際に本研究当初には、GUC コドンが  $MeY$  とバリンの両方に翻訳されてしまっていた (図6)。これは  $MeY$  導入の効率が不十分であるために、Val-tRNA<sub>CAC</sub> が GUC コドンを読解するという翻訳のエラーが起こってしまったためである。そこで、翻訳効率に影響すると想定される各要素 ( $MeY$ -tRNA 濃度、aaRS 濃度、EF-Tu 濃度、 $Mg^{2+}$  濃度、反応時間等)の最適化を行った[1]。最適化された条件において、バリンコドンボックス人工分割の正確性と効率について評価した結果を図7に示す。レーン1から4は GUG コドンの翻訳を評価した結果である (図7B)。まずレーン1は天然 tRNA を加えたコントロールであり、バリン含有ペプチドが合成された。レーン2は GUC コドンに対応する tRNA を加えないネガティブコントロールである。レーン3は転写 tRNA<sup>Val</sup><sub>CAC</sub> を加えた条件であり、GUC コドンに対応してバリンが導入された。レーン4は転写 tRNA<sup>Val</sup><sub>CAC</sub> のみならず  $MeY$ -tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> を加えた条件である。この条件においても、GUC コドンは Val-tRNA<sup>Val</sup><sub>CAC</sub> により正確に解読され、 $MeY$ -tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> による翻訳エラーは起こらないことが、ペプチド産物の MALDI-TOF-MS によって確認された (図7C)。次のレーン5から8は GUC コドンの翻訳を評価した結果である。レーン5は天然 tRNA を加えたコントロールであり、天然の遺伝暗号に従ってバリンが導入された。次のレーン6は GUC コドンに対応する tRNA を加えないネガティブコントロールである。レーン7は  $MeY$ -tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> を加えた条件で、期待通り GUC コドンに対応して  $MeY$  が導入された。レーン8の  $MeY$ -tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> と転写 tRNA<sup>Val</sup><sub>CAC</sub> の両方を加えた条件においても、GUC コドンが  $MeY$ -tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> により正確に解読されることが tricine-SDS-PAGE 後のバンドシフトと MALDI-TOF-MS により確認された (図7B、C)。この実験により、人工分割したコドンボックスにバリンに加えて特殊アミノ酸を対応づけることが可能であり、その翻訳反応の正確性や効率も十分であることが実証された。

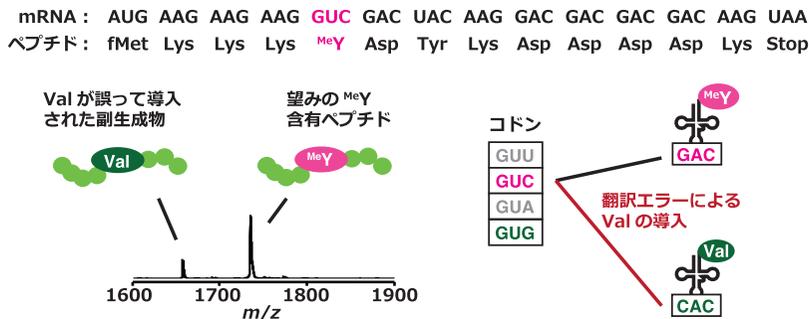


図6. 翻訳条件の最適化を行う前は、GUC コドンに対してバリンが導入されるという翻訳エラーが観察された。

**A** mRNA1-GUG: AUG AAG AAG AAG GUG GAC UAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG UAA  
P1-Val: fMet Lys Lys Lys Val Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Stop

mRNA1-GUC: AUG AAG AAG AAG GUC GAC UAC AAG GAC GAC GAC GAC AAG UAA  
P1-MeY: fMet Lys Lys Lys MeY Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Stop

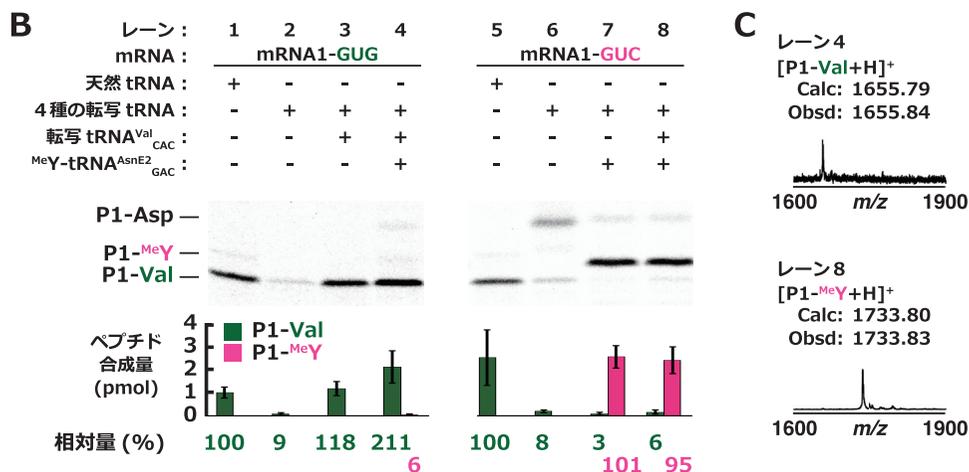


図7. 人工分割したコドンボックスの正確かつ高効率な翻訳反応 (A) 実験に用いた2種の mRNA と翻訳後のペプチド配列。(B) tricine-SDS-PAGE 後のオートラジオグラフィーによるペプチドの合成効率評価。4種の転写 tRNA: tRNA<sup>Ini</sup><sub>CAU</sub>、tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub>、tRNA<sup>Asp</sup><sub>GUC</sub>、tRNA<sup>Tyr</sup><sub>GUA</sub>; エラーバー: 標準偏差 (C) MALDI-TOF-MS による翻訳の正確性評価。[1]

## 5. アルギニンコドンボックスへ2種の特特殊アミノ酸を対応付ける

天然の遺伝暗号では、アルギニンは6つのコドンに対応づけられている。そのため、アルギニンを AGG コドンに残したまま、人工分割した CGN コドンボックスに2種の特特殊アミノ酸を対応づけることができるはずである(図8)。そこで AGG、CGC、CGG コドンをそれぞれアルギニン、N-メチルセリン(<sup>Me</sup>S)、N<sup>ε</sup>-アセチルリシン(<sup>Ac</sup>K)に対応づけることで、基質アミノ酸を22種まで拡大する実証実験を試みた。まずコントロールとして、前述の「32転写 tRNA 翻訳系」により翻訳した結果、天然の遺伝暗号通りにアルギニンを3つ含んだペプチドが合成された(図8B)。次に「32転写 tRNA 翻訳系」から、CGC コドンに対応する転写 tRNA<sup>Arg</sup><sub>GCC</sub> と CGG コドンに対応する転写 tRNA<sup>Arg</sup><sub>CCG</sub> を排除し、代わりにフレキシザイムにより調製した<sup>Me</sup>S-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GCC</sub> と<sup>Ac</sup>K-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>CCG</sub> を加えた。翻訳反応後のペプチド産物を MALDI-TOF-MS で解析した結果、設計通りのペプチドが翻訳されていることが確認された(図8C)。この実験により、人工分割したコドンボックスに2種の特特殊アミノ酸を対応付けられることが実証された。

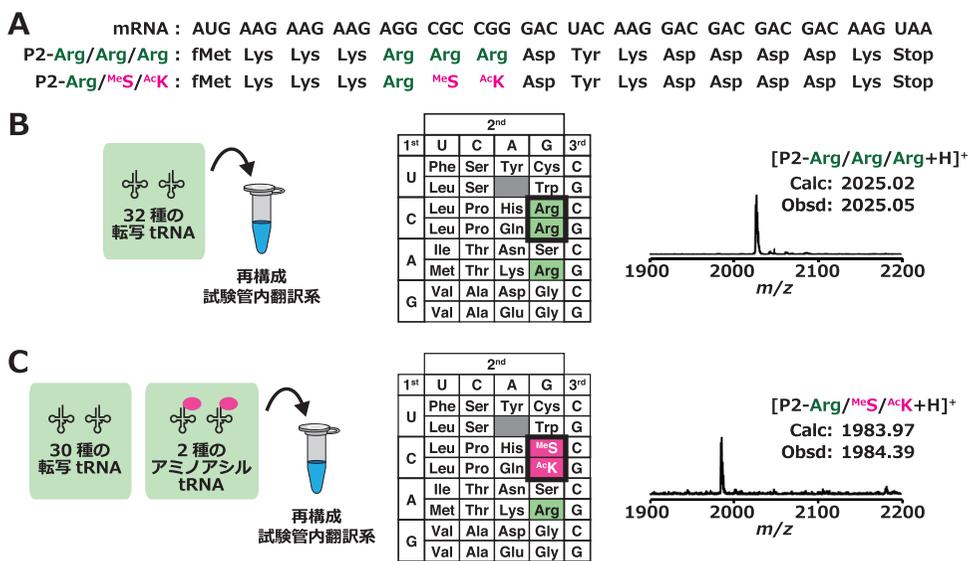


図8. 人工分割したコドンボックスに2種の特種アミノ酸を当てはめることで、基質アミノ酸の種類を22種に拡大する (A) 実験に用いた mRNA と翻訳後のペプチド配列。(B) 32 転写 tRNA 翻訳系において合成したペプチド産物の MALDI-TOF-MS 解析。(C) 遺伝暗号を改変した翻訳系において合成したペプチド産物の MALDI-TOF-MS 解析。[1]

## 6. 複数コドンボックスの同時人工分割

次に3つのコドンボックスを同時に人工分割し、AcK、p-ヨードフェニルアラニン (IodoF)、シトルリン (Cit) の3種の特種アミノ酸を追加することで、基質アミノ酸を23種に拡大することを試みた(図9)。この実験で使用した mRNA は人工分割の対象とする GGC、GGG、CGC、CGG、GUC、GUG コドンをもつ1つずつ含み、また20種の各天然アミノ酸へと翻訳されるコドンをもつ1つずつ含む。この実験では、「32 転写 tRNA 翻訳系」から GGC、CGC、GUC コドンをもつ3種の転写 tRNA を排除し、代わりにフレキシザイムにより調製した AcK-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GCC</sub>、IodoF-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GCG</sub>、Cit-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub> を加えた。翻訳反応後のペプチド産物を MALDI-TOF-MS で解析した結果、23種の基質アミノ酸を全て含むペプチドが合成されていることが確認された(図9)。またその合成効率は、天然 tRNA を加えたコン

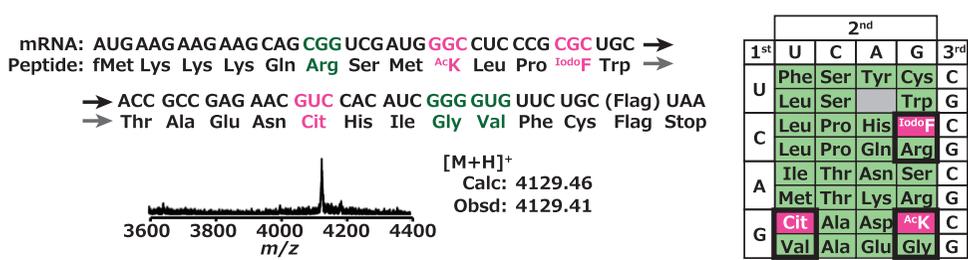


図9. 複数コドンボックスの同時人工分割 3つのコドンボックスを同時に人工分割することで、23種の基質アミノ酸を全て含むペプチドを正確に翻訳合成できた。[1]

トロールに対して15%であった[1]。これだけ人工的な要素を組み込んだ翻訳系であるにも関わらず、望みのペプチドだけが正確に翻訳合成されたことは、特筆すべき成果である。この実験により、コドンボックス人工分割法によって基質アミノ酸の種類を23種にまで拡大できることが実証された。

## 7. 大環状特殊ペプチド薬剤の翻訳合成

本研究ではさらに、「コドンボックス人工分割法」と既存のペプチド環化法を組み合わせ、特殊ペプチド薬剤を翻訳合成することを試みた(図10)。「CM<sub>11</sub>-1」は先行研究で開発されたE6AP HECT ドメインに対する大環状ペプチド薬剤であり、直鎖ペプチドとして翻訳合成された後に、N末端のクロロアセチル基とシステイン間の自発的な環化反応により大環状ペプチドが形成される[7]。この実験では「32転写 tRNA 翻訳系」からメチオニンを排除し、代わりにフレキシザイムにより調製したClAc<sup>DW</sup>-tRNA<sup>Ini</sup><sub>CAU</sub>(ClAc<sup>DW</sup>: クロロアセチル-D-トリプトファン)を加えた。それにより翻訳開始アミノ酸がホルミルメチオニンからClAc<sup>DW</sup>に変更される。さらに「32転写 tRNA 翻訳系」からGGC、CGC、GUCコドン翻訳する3種の転写 tRNA を排除し、代わりにフレキシザイムにより調製した<sup>Me</sup>G-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GCC</sub>、<sup>Me</sup>S-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GCG</sub>、<sup>Me</sup>F-tRNA<sup>AsnE2</sup><sub>GAC</sub>(<sup>Me</sup>G: N-メチルグリシン; <sup>Me</sup>F: N-メチルフェニルアラニン)を加えた。この条件におけるペプチド産物をMALDI-TOF-MSにより解析した結果、設計通りのCM<sub>11</sub>-1ペプチドが正確に翻訳合成されていることが確認された。この実験により、22種ものアミノ酸を基質とする翻訳系において、CM<sub>11</sub>-1のような大環状特殊ペプチド薬剤を翻訳合成できることが実証された。

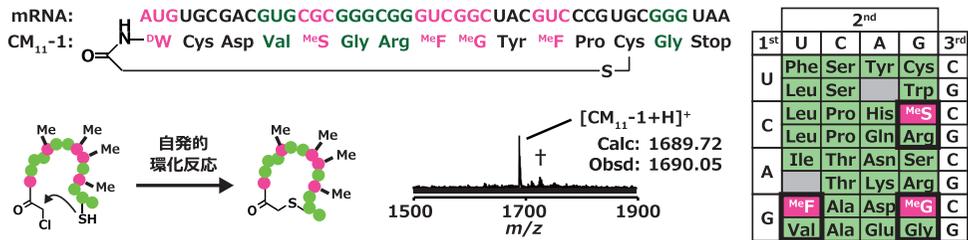


図10. コドンボックス人工分割法を利用した大環状特殊ペプチド薬剤の翻訳合成  
 †は環化する前の直鎖ペプチドを示す。[1]

## 8. まとめと今後の展望

生物はその進化の結果として、64種のコドンをもつ20種のアミノ酸に翻訳するという冗長な遺伝暗号を持つ。本研究ではこの冗長な遺伝暗号を解きほぐし、基質アミノ酸の種類を拡大する新技術「コドンボックス人工分割法」を開発した。原理上、本手法により20種の天然アミノ酸に加えて11種もの特殊アミノ酸を翻訳基質として追加することが可能となる。

### 特殊ペプチド創薬への応用

特殊アミノ酸を含むペプチドの利用価値は非常に高く、創薬やケミカルバイオロジーの分

野に革新をもたらした[8]。例えば我々の研究室では、特殊ペプチド創薬の研究を行っている(図11)。翻訳反応を利用することで一兆( $=10^{12}$ )もの特殊ペプチドライブラリーをワンポットで合成し、その莫大な多様性の中から創薬標的に結合するペプチド薬剤をスクリーニングすることができる[7、9-11]。しかし翻訳反応では化学合成のように任意の構成要素を組み込めるわけではなく、典型的には20種のアミノ酸に限られるという欠点を持つ。本研究のコドンボックス人工分割法は、この状況を打開できる技術である。本手法により、20種以上の多様な構成要素からなるペプチドライブラリーの構築が可能となり、創薬標的タンパク質により強く、より選択的に結合するペプチド薬剤の開発につながると期待される。また本研究により、多数のNメチルアミノ酸を高効率で導入できる翻訳系が確立されたことにも言及したい。本研究をさらに突き詰め、Nメチルアミノ酸を50%以上含む高度Nメチル化ペプチドライブラリーを翻訳合成することができれば、天然物のシクロスポリンのように膜透過性や生体内安定性に優れたペプチド薬剤の開発につながると期待される。

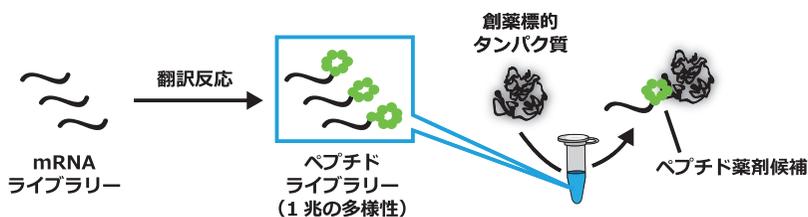


図11. 翻訳反応を応用した大環状ペプチド薬剤スクリーニング

#### 生きた生物内でのコドンボックス人工分割の達成

本研究の対象は試験管内翻訳系であったが、生きた生物内でコドンボックス人工分割を達成することは可能であろうか。この実現には二つの大きな課題がある。第一の課題は、生物は既に64種のコドンと天然 tRNA を生命活動のために使用しているため、人が勝手に遺伝暗号を改変すると生きていられなくなるという問題である。そのため既存の生物を出発点とすることは現実的ではない。そこで注目されるのが、全ゲノム合成の技術である(図12)[12]。なぜなら、ゲノム合成においては任意のコドンを選択することが可能であり、例えばバリンへと翻訳される全コドンを GUG コドンに集約することが原理上可能だからである。それにより多数の「空きコドン」を持つ生物が誕生すると期待される。第二の課題は、生きた生物の中ではフレキシザイムによるアミノ酸付加反応は使えないため、特殊アミノ酸の数だけ専用の直交型 tRNA - aaRS ペアを開発する必要があるという問題である。現状同一生物内で使用できる直交型 tRNA - aaRS ペアは2種類に限られるため[13]、今後さらなる発展が求められる。これら2つの課題を将来的に克服することで、生きた生物においてコドンボックス人工分割を達成し、20種の天然アミノ酸に加えて多数の特殊アミノ酸を翻訳基質とする生物が誕生すると期待される。

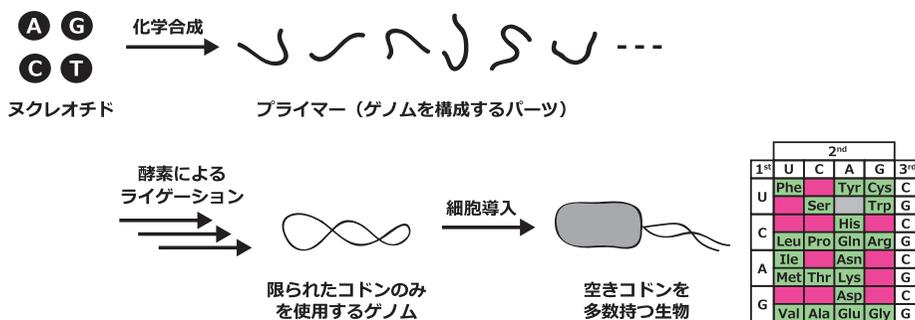


図12. ゲノム合成の技術を応用することで、将来的に生きた生物においてもコドンボックス人工分割が達成されると期待される。

## 9. おわりに

人類による生物利用の様子は、近年大きな変革を迎えている。すなわち、人が生物の遺伝子を組み替え、生合成系を人工的に改変し、望むがままのペプチドやタンパク質を大量合成させるようになった。代表例として、インスリンなどのペプチド医薬合成、抗体などのタンパク質医薬合成、遺伝子組換え酵素によるバイオリクター構築などが挙げられる。ポリペプチド合成系を利用する際に、構成要素が20種のアミノ酸に限られるという制限は足かせとなるが、このルールは生物の常識であり仕方がないと認識されてきた。本研究ではこの既存概念を覆し、実際に23種のアミノ酸を構成要素とするポリペプチドの翻訳合成に成功した。「コドンボックス人工分割法」が今後多くの分野で応用され、20種のレパートリーでは達成しえない優れた特殊ポリペプチド医薬や特殊酵素の開発に貢献することを願う。

## 参考文献

1. Iwane, Y. *et al.* Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes. *Nat Chem* **8**, 317-325 (2016).
2. Nasvall, S. J., Chen, P. & Bjork, G. R. The wobble hypothesis revisited: Uridine-5-oxyacetic acid is critical for reading of G-ending codons. *RNA* **13**, 2151-2164 (2007).
3. Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H. & Suga, H. A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis. *Nat. Methods* **3**, 357-359 (2006).
4. Ohta, A., Murakami, H., Higashimura, E. & Suga, H. Synthesis of polyester by means of genetic code reprogramming. *Chem. Biol.* **14**, 1315-1322 (2007).
5. Gustilo, E. M., Vendeix, F. A. & Agris, P. F. tRNA's modifications bring order to gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 134-140 (2008).
6. Agris, P. F., Vendeix, F. A. & Graham, W. D. tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* **366**, 1-13 (2007).
7. Yamagishi, Y. *et al.* Natural product-like macrocyclic *N*-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. *Chem. Biol.* **18**, 1562-1570 (2011).

8. Passioura, T., Katoh, T., Goto, Y. & Suga, H. Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 727-752 (2014).
9. Morimoto, J., Hayashi, Y. & Suga, H. Discovery of macrocyclic peptides armed with a mechanism-based warhead: isoform-selective inhibition of human deacetylase SIRT2. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 3423-3427 (2012).
10. Hayashi, Y., Morimoto, J. & Suga, H. *In vitro* selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors. *ACS chemical biology* **7**, 607-613 (2012).
11. Tanaka, Y. *et al.* Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature* **496**, 247-251 (2013).
12. Gibson, D. G. *et al.* Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. *Science* **329**, 52-56 (2010).
13. Chin, J. W. Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 379-408 (2014).

