

## β-アミノ酸を複数個含むペプチドの翻訳合成



藤野 公茂

(工学研究科 化学・生物工学専攻)

### 1. β-アミノ酸は翻訳系で利用できるか？

近年、リボソームは、様々な非タンパク質性アミノ酸に対して、高い基質許容性を持つことが明らかになってきた。この知見に基づき、非タンパク質性アミノ酸を含む多様なペプチド群（ペプチドライブラリ）をリボソームにより合成し、この中から薬剤ペプチドや分子プローブを取得する研究が進められている。

もし、ペプチドライブラリに非タンパク質性アミノ酸を自由に導入できるとしたら、どのようなアミノ酸が有効だろうか？そこで我々は、β-アミノ酸に着目した。β-アミノ酸とは、カルボキシル基とアミノ基が、α位とβ位の炭素にそれぞれ結合したアミノ酸である。生体内の翻訳系で利用されるアミノ酸は、20種類のα-アミノ酸に限られているため、β-アミノ酸がタンパク質に含まれることは稀である。しかし、生理活性分子の構成要素としては多くの例が見られ、抗ガン作用を持つパクリタキセルや補酵素 A などにβ-アミノ酸型の構造が含まれる。また、β-アミノ酸がペプチドに導入された場合、加水分解耐性を上昇させるため<sup>1)</sup>、加水分解酵素の存在する *in vivo* の条件にも適用できる可能性が高くなる。もし、β-アミノ酸を導入したペプチドをライブラリ化することができれば、非常に有用なペプチドライブラリとなるだろう。

では、実際の翻訳系において、β-アミノ酸を利用することはできるのだろうか？

β-アミノ酸を結合したアミノアシル tRNA を人工的に合成する手法<sup>2, 3)</sup>と、無細胞翻訳系の技術

が開発されたことで、β-アミノ酸の翻訳系での利用を検証することが可能になった。しかし、先行研究ではβ-アミノ酸の利用について、一致した見解が得られていなかった<sup>1, 4, 5, 6, 7)</sup>。これは用いられた無細胞翻訳系が、β-アミノ酸の導入活性を測定するのに適切なものでなかったことが原因と考えられる。そこで本研究では、「β-アミノ酸は翻訳系で利用できるか」という問いに明確な答えを出すことを目指した<sup>8)</sup>。

### 2. β-アミノ酸の翻訳導入の評価方法

β-アミノ酸の翻訳導入に関する研究では、構造の単純な βhGly (β-Ala と呼ばれる) がよく用いられる。しかし、先行研究では βhGly の翻訳について、導入可能・不可能の両方の報告があり、一致した見解は得られなかった。そこで我々は、タンパク質性のα-アミノ酸と同じ側鎖を持つ、16種類のβ-アミノ酸を用意し、下記の最適化した翻訳系を用いて、包括的に翻訳導入活性の評価を行うことを目指した。

フレキシザイムによるアミノアシル化法<sup>3)</sup>と再構成無細胞翻訳系を組み合わせることで遺伝暗号をリプログラムした、改変型の無細胞翻訳系 (Flexible *in vitro* translation system, FIT システム<sup>9)</sup>) の調製を行った (図 1)。具体的には、まずフレキシザイムを用いることで、β-アミノ酸を UCC コドン (αSer コドン) に対応する tRNA<sup>EnAsn<sub>GGA</sub></sup> に結合し、16種類のβ-アミノアシル tRNA<sup>EnAsn<sub>GGA</sub></sup> を作製した。得られたβ-アミノアシル tRNA を、αSer とセリル tRNA 合成酵素を

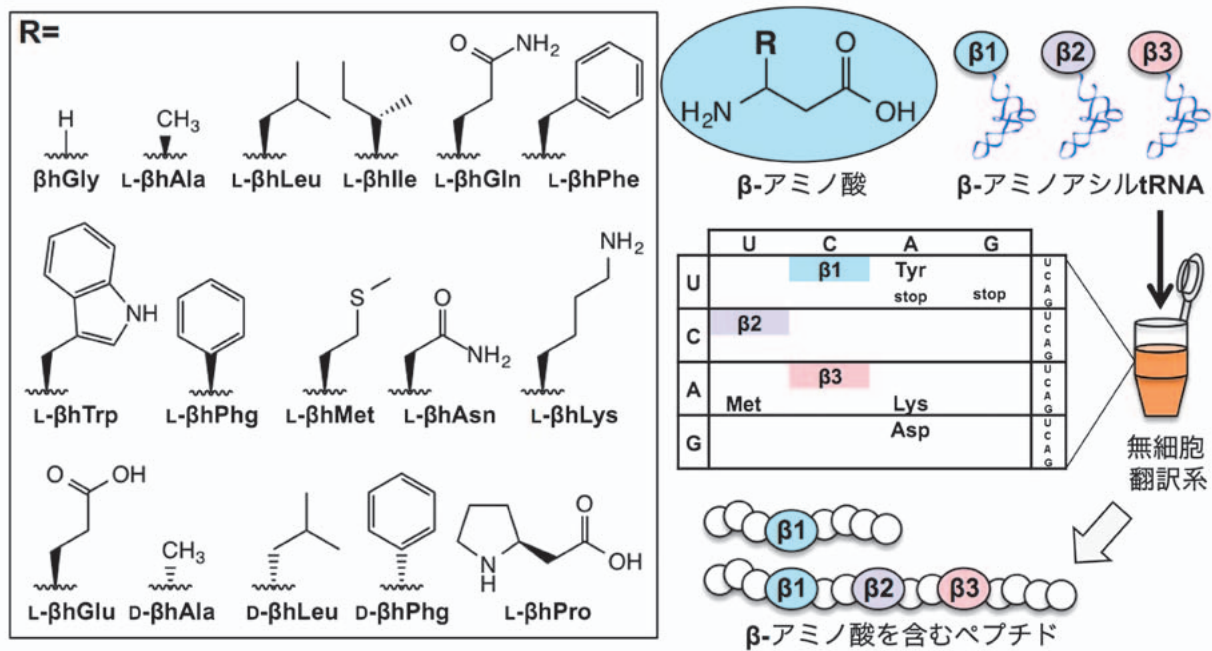


図 1.  $\beta$ -アミノ酸の翻訳導入を評価する系。

除いた再構成無細胞翻訳系に加えることで、モデルペプチドの翻訳合成を行なった。この翻訳反応液中では、 $\alpha$ Ser-tRNA<sup>Ser</sup><sub>GGA</sub>が合成されないため、mRNA上のUCCコドンは、対応する $\alpha$ -アミノ酸が存在しない空コドンとなる。ここに、 $\beta$ -アミノアシル tRNA<sup>EnAsn</sup><sub>GGA</sub>が $\beta$ -アミノ酸を運搬することにより、UCCコドンに対応して $\beta$ -アミノ酸が導入される。この系では、 $\beta$ -アミノ酸の導入を阻害する可能性のある、タンパク質性アミノ酸の導入との競合が起こらない。これにより、リボソームによる $\beta$ -アミノ酸の導入を直接的に検証することが可能である。

### 3. $\beta$ -アミノ酸1残基のペプチドへの導入

始めに、 $\beta$ -アミノ酸1残基のモデルペプチド p1 (図 2 a) への導入について検証を行った。まずは、質量分析 (MALDI-TOF-MS) を用いてペプチド p1 の質量を測定し、ペプチドに導入可能な $\beta$ -アミノ酸の種類を調べた (図 2 b)。その結果、13種類の $\beta$ -アミノ酸 ( $\beta$ hGly, L- $\beta$ hAla, L- $\beta$ hLeu, L- $\beta$ hIle, L- $\beta$ hGln, L- $\beta$ hPhe, L- $\beta$ hPhg, L- $\beta$ hMet, L- $\beta$ hAsn, L- $\beta$ hLys, D- $\beta$ hAla, D- $\beta$ hLeu, D- $\beta$ hPhg) を用いた場合に、モデルペプチド p1 に相当する質量の産物が確認できた。一方、それ以外の3種

類の $\beta$ -アミノ酸 (L- $\beta$ hPro, L- $\beta$ hTrp, L- $\beta$ hGlu) については、産物が見られないか、短いペプチドのみが確認された。この結果から、13種類の $\beta$ -アミノ酸が、翻訳系によってペプチド p1 に導入可能であることが明らかになった。

続いて、電気泳動 (Tricine-SDS-PAGE) を用いることで、各 $\beta$ -アミノ酸の導入されたモデルペプチド p1 の定量を行った。<sup>14</sup>C]-Asp を添加した翻訳系を用いると、モデルペプチド p1 に $\beta$ -アミノ酸が導入された場合のみ、下流のFLAG配列に<sup>14</sup>C]-Asp が取り込まれ、ペプチドが放射性標識される (図 2 a)。これを電気泳動して得られたペプチドのバンド強度を定量することで、各 $\beta$ -アミノ酸のペプチドへの導入効率が明らかになった (図 2 c)。その結果をまとめると、 $\beta$ -アミノ酸の側鎖の構造と翻訳導入効率に関係性が見出された。側鎖の小さい $\beta$ -アミノ酸 ( $\beta$ hGly, L- $\beta$ hAla) は高い導入効率を示した。脂肪鎖の嵩高い $\beta$ -アミノ酸 (L- $\beta$ hLeu, L- $\beta$ hIle) は中程度の導入効率を示した。また、側鎖に電荷のある $\beta$ -アミノ酸 (L- $\beta$ hGlu, L- $\beta$ hLys) では、導入効率が低いか、翻訳産物が得られなかった。一方、側鎖にアミド構造を持つ $\beta$ -アミノ酸 (L- $\beta$ hGln, L- $\beta$ hAsn)、側鎖に芳香環を持つ $\beta$ -アミノ酸 (L- $\beta$ hPhe, L- $\beta$ hTrp, L- $\beta$ hPhg) で

は、導入効率に一貫した傾向は見られなかった。興味深いことに、ここで見られる側鎖と翻訳導入効率の関係は、 $\beta$ -アミノ酸と同様に主鎖骨格に非タンパク質型の構造を持つアミノ酸として研究されている D 体アミノ酸<sup>10)</sup>、N-メチルアミノ酸<sup>11)</sup>の、側鎖と導入効率の関係と共通していることが分かった。

#### 4. $\beta$ -アミノ酸 2 残基のペプチドへの導入

さらに、 $\beta$ -アミノ酸 2 残基を含むペプチドが翻訳合成可能なのか検証を行った。対象とする  $\beta$ -アミノ酸として、1 残基の導入で高い翻訳導入効率を示した  $\beta$ hGly を選択した。まずは、連続した 2 残基の  $\beta$ -アミノ酸を含むモデルペプチド p2 (図 3 a) の翻訳を試みた。しかし、 $\beta$ hGly を 2 残基

連続で含むペプチドの翻訳合成量は、対照として  $\alpha$ Gly を用いたペプチド p2 に比べて、非常に低いことが分かった(図 3 b)。そこで、 $\beta$ -アミノ酸 2 残基の間にタンパク質性の  $\alpha$ -アミノ酸を配置することで、 $\beta$ -アミノ酸の導入効率を上昇させることを試みた。2 残基の  $\beta$ -アミノ酸の間に、1 - 3 残基の  $\alpha$ Tyr を配置した新たなモデルペプチド p3, p4, p5 (図 3 a) をデザインし、 $\beta$ hGly の導入を行った。その結果、1 残基の  $\alpha$ Tyr を配置しただけでは、導入効率は低いままだったが、2 残基または 3 残基の  $\alpha$ Tyr を配置することで、 $\alpha$ Gly を用いた対照実験と同程度の合成量まで回復することが分かった(図 3 b)。面白いことに、 $\beta$ -アミノ酸 2 残基の導入で見られるこの性質についても、D 体アミノ酸で同様の性質が見られることが分かっ

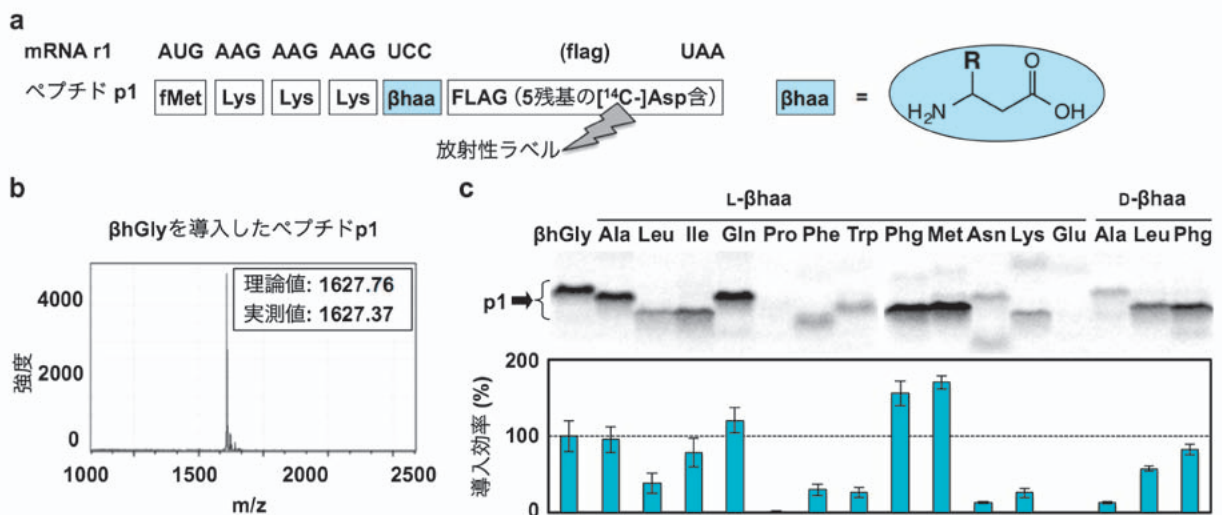


図 2.  $\beta$ -アミノ酸 1 残基のペプチドへの導入。(a)  $\beta$ -アミノ酸を導入するペプチド p1 の配列。(b)  $\beta$ hGly を導入したペプチド p1 の質量分析。(c) 16 種類の  $\beta$ -アミノ酸の翻訳導入効率。 $\beta$ hGly を用いた場合を 100% として示した。

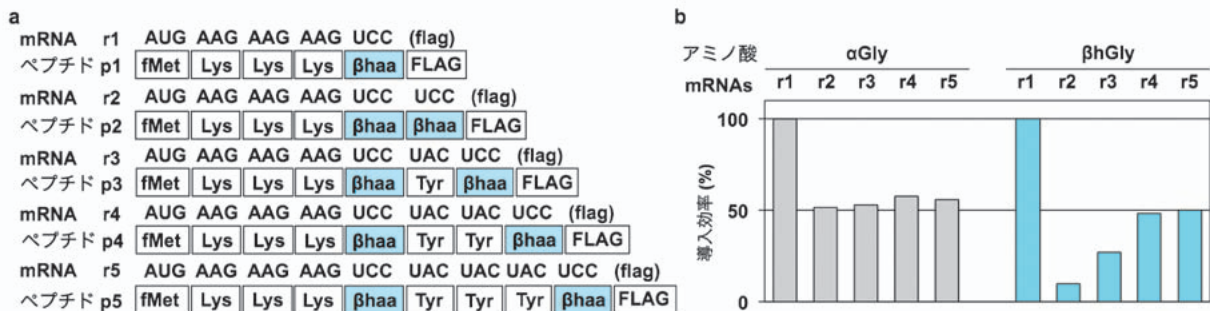


図 3.  $\beta$ -アミノ酸 2 残基のペプチドへの導入。(a) 2 残基の  $\beta$ -アミノ酸を導入するペプチド p2-p5 の配列。(b) 2 残基の  $\beta$ hGly の翻訳導入効率。 $\alpha$ Gly の導入を対照として用いた。それぞれ、ペプチド p1 へのアミノ酸 1 残基の導入効率を 100% として示した。

ている<sup>10)</sup>。一方、*N*-メチルアミノ酸<sup>11)</sup>ではこの性質は観察されていない。

### 5. 3種類のβ-アミノ酸を導入したペプチドの翻訳合成

ここまでの結果から得られた、1残基および2残基のβ-アミノ酸の導入に関する知見を利用し、異なる3種類のβ-アミノ酸を含むペプチドを翻訳系により合成することを試みた。β-アミノ酸の間に2残基のαTyrを配置したモデルペプチドp6 (図4a)をデザインし、1残基での導入効率の高かったL-βhAla, L-βhPhg, L-βhGlnの導入を行った。用いた改変型無細胞翻訳系では、3つのコドンに対して非タンパク質性アミノ酸が対応付けされ (図4b)、ペプチドへ導入される。翻訳産物の質量分析の結果、3種類のβ-アミノ酸を含むペプチドp6が検出された (図4c)。これは、3種類のβ-アミノ酸を含むペプチドの翻訳合成に成功した初めての例である。

### 6. 結論

本研究では、β-アミノ酸の翻訳系での利用について、16種類のβ-アミノ酸を用いて検証を行った。その結果、翻訳系でペプチドに導入可能な13種類のβ-アミノ酸を同定することができた。また、β-アミノ酸2残基の翻訳導入は、β-アミノ酸の間に2残基以上のα-アミノ酸を挟むという条件付きで可能であることも明らかにした。さらに、3種類のβ-アミノ酸を含むペプチドの翻訳合

成にも成功した。

近年、mRNA提示法、TRAP提示法(transcription-translation coupled with association of puromycin linker display, TRAP display<sup>12)</sup>)などの、翻訳系を利用したペプチドライブラリ構築法の研究が進められている。ここに、今回得られた知見を利用すれば、β-アミノ酸を含むペプチドライブラリの構築も可能になる。β-アミノ酸を導入することで、ライブラリの構造多様性が上昇すれば、薬剤候補や分子プローブの取得に非常に有用なライブラリとなることが期待できる。さらに、β-アミノ酸は、導入されたペプチドの加水分解耐性を上昇させる<sup>1)</sup>ので、ペプチドライブラリの実用性も向上するだろう。

### 7. 展望～さらなる非タンパク質性アミノ酸の利用へ

本研究では、複数残基のβ-アミノ酸を含むペプチドの翻訳合成に成功したが、一方で、翻訳系に適合しないβ-アミノ酸の側鎖や、連続導入における制限も明らかになった。現在、様々な非タンパク質性アミノ酸を効率的に導入可能な、改変翻訳系の開発も進められている。実際、非タンパク質性アミノ酸を結合するtRNA、そのtRNAを輸送するEF-Tu、翻訳反応を触媒するリボソームなどの翻訳因子を改変し、非タンパク質性アミノ酸の導入効率を改善した例も報告されている<sup>1)</sup>。将来的には、非タンパク質型の構造を持つペプチドを、自由に翻訳合成することが可能になると期待する。

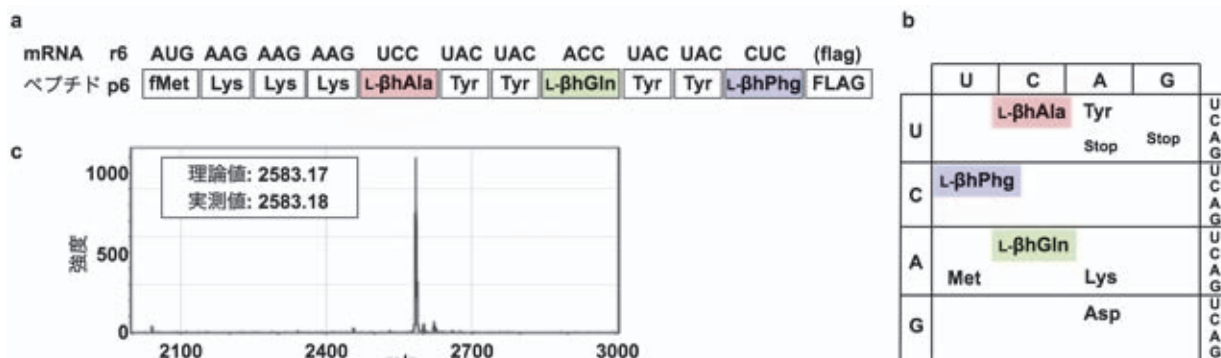


図4. 3種類のβ-アミノ酸を含むペプチドの翻訳合成。(a) 3種類のβ-アミノ酸を導入するペプチドp6の配列。(b) β-アミノ酸の導入のためのリプログラムした遺伝暗号表。(c) 3種類のβ-アミノ酸を導入したペプチドp6の質量分析。

## 8. 謝辞

このたびは、本稿執筆の機会を戴き、ありがとうございました。また、 $^{14}\text{C}$ -Asp を利用したペプチド翻訳合成量の定量実験は、名古屋大学アイソトープ総合センターにおいて実施しました。同センターのスタッフの皆さまのサポートに深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Maini, R., Nguyen, D. T., Chen, S., Dedkova, L. M., Chowdhury, S. R., Alcalá-Torano, R., Hecht, S. M. (2013) Incorporation of  $\beta$ -amino acids into dihydrofolate reductase by ribosomes having modifications in the peptidyl-transferase center. *Bioorg Med Chem.* **21**, 1088-1096.
- 2) Heckler, T. G., Chang, L. H., Zama, Y., Naka, T., Chorghade, M. S., Hecht, S. M. (1984) T4 RNA ligase mediated preparation of novel "chemically misacylated" tRNA<sup>Phe</sup>s. *Biochemistry.* **23**, 1468-1473.
- 3) Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H., Suga, H. (2006) A highly flexible tRNA acylation method for non-natural polypeptide synthesis. *Nat Methods.* **3**, 357-359.
- 4) Ellman, J. A., Mendel, D., Schultz, P. G. (1992) Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins. *Science.* **255**, 197-200.
- 5) Bain, J. D., Wacker, D. A., Kuo, E. E., Chamberlin, A. R. (1991) Site-specific incorporation of non-natural residues into peptides: Effect of residue structure on suppression and translation efficiencies. *Tetrahedron.* **47**, 2389-2400.
- 6) Sando, S., Abe, K., Sato, N., Shibata, T., Mizusawa, K., Aoyama, Y. (2007) Unexpected preference of the E. coli translation system for the ester bond during incorporation of backbone-elongated substrates. *J Am Chem Soc.* **129**, 6180-6186.
- 7) Tan, Z., Forster, A. C., Blacklow, S. C., Cornish, V. W. (2004) Amino acid backbone specificity of the Escherichia coli translation machinery. *J Am Chem Soc.* **126**, 12752-12753.
- 8) Fujino, T., Goto, Y., Suga, H., Murakami, H. (2016) Ribosomal Synthesis of Peptides with Multiple  $\beta$ -Amino Acids. *J Am Chem Soc.* **138**, 1962-1969.
- 9) Goto, Y., Katoh, T., Suga, H. (2011) Flexizymes for genetic code reprogramming. *Nat Protocols.* **6**, 779-790.
- 10) Fujino, T., Goto, Y., Suga, H., Murakami, H. (2013) Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation. *J Am Chem Soc.* **135**, 1830-1837.
- 11) Kawakami, T., Murakami, H., Suga, H. (2008) Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. *Chem Biol.* **15**, 32-42.
- 12) Ishizawa, T., Kawakami, T., Reid, P. C., Murakami, H. (2013) TRAP display: a high-speed selection method for the generation of functional polypeptides. *J Am Chem Soc.* **135**, 5433-5440.