

124. 細胞膜透過性環状ペプチドに有用な翻訳開始基質の開発

川上 隆史

Key words : PURE システム, N-アルキルアミノ酸,
アミド不含カルボン酸翻訳開始, 二環状ペプチド,
プロテオミクス

*東京大学 大学院総合文化研究科
広域科学専攻 生命環境科学系

緒言

N-アルキルアミノ酸はペプチドの分解酵素耐性だけでなく, 細胞膜透過性も向上させる非常に有用な非天然アミノ酸である. 我々はこれまでに大腸菌由来の再構築型無細胞翻訳系 (PURE システム) を用いて, 様々な N-アルキルアミノ酸 (N-メチルアミノ酸, N-アルキルグリシン, 環状 N-アルキルアミノ酸など) の翻訳伸長におけるペプチド鎖への導入を報告してきた¹⁻⁵⁾. また, 翻訳後の選択的化学反应や酵素反応を用いることによって, 直接は翻訳不可能な荷電 N-アルキルアミノ酸を, 翻訳ペプチドに導入することにも成功してきた⁶⁾. 更に, これらの N-アルキルアミノ酸翻訳を用いて, 新規の環状 N-アルキルペプチドリガンドを創製してきた⁷⁾. しかしながら, N-アルキルアミノ酸でリボソーム翻訳を開始させ N 末端に N-アルキルアミノ酸を持つペプチドを翻訳合成する例は未だ報告されていない.

本研究で我々は, 大腸菌由来の再構築型無細胞翻訳系 (PURE システム) を用いて, 細胞膜透過性を向上させる N-アルキルアミノ酸により翻訳を開始させ, かつ, 翻訳ペプチドを環状化させる新規の N-アルキルアミノ酸群を開発した (図 1). また, 更なる細胞膜透過性の向上に有効な, アミド結合を持たないカルボン酸により翻訳開始・環状化をさせる新規の芳香環含有カルボン酸群 (pClPh, mClPh, mClBn) を開発した (図 1). 更に, アミド結合を持たないカルボン酸により翻訳開始および二環状化 (bi-cyclization) をさせる新規の芳香環含有カルボン酸 3,5-bis(chloromethyl)benzoic acid (Cl₂Ph) を開発した (図 1).

方法

大腸菌由来の再構築型無細胞翻訳系 (PURE システム) を用いて, 様々な N-アルキルアミノ酸, および, アミド結合を持たないカルボン酸によるペプチド翻訳開始とペプチド環状化を行い, 放射性同位体標識や質量分析により評価した.

結果

無電荷・非芳香族の N-メチルアミノ酸 (MeGly, MeAla, MeSer, MeThr, MeVal, MeIle, MeLeu) の翻訳開始効率は中程度であった (図 2). 一方, 芳香族の N-メチルアミノ酸 (MePhe, MeTyr, MeTrp) は, 高効率で翻訳開始反応が進行した (図 2). しかし, 荷電 N-メチルアミノ酸 (MeLys, MeArg, MeAsp, MeGlu) の翻訳開始は比較的 low 効率で行われた (図 2). この結果から, 翻訳伸長が不可能であった N-メチルアミノ酸でも (MeVal, MeIle, MeLeu, MeLys, MeArg, MeAsp, MeGlu), 翻訳開始は可能であることが判明した. 同様の結果は, 非タンパク質性側鎖を有する N-メチルアミノ酸でも観察された. MeFcl は, MeNva と MeNle より高効率で翻訳開始が進行した (図 2). 例外は MePhg であったが, MePhg は翻訳伸長効率も非常に低いことが同時に判明した. 環状 N-アルキルアミノ酸 (Pro, Hyp, Aze) の翻訳開始は予想外に low 効率であった (図 2). ペプチド用 N-アルキルグリシンによる翻訳開始効率については, EtGly は中程度であり, 翻訳伸長不可能な BuGly は高効率であった (図 2).

*現所属: 産業技術総合研究所 創薬分子プロファイリング研究センター

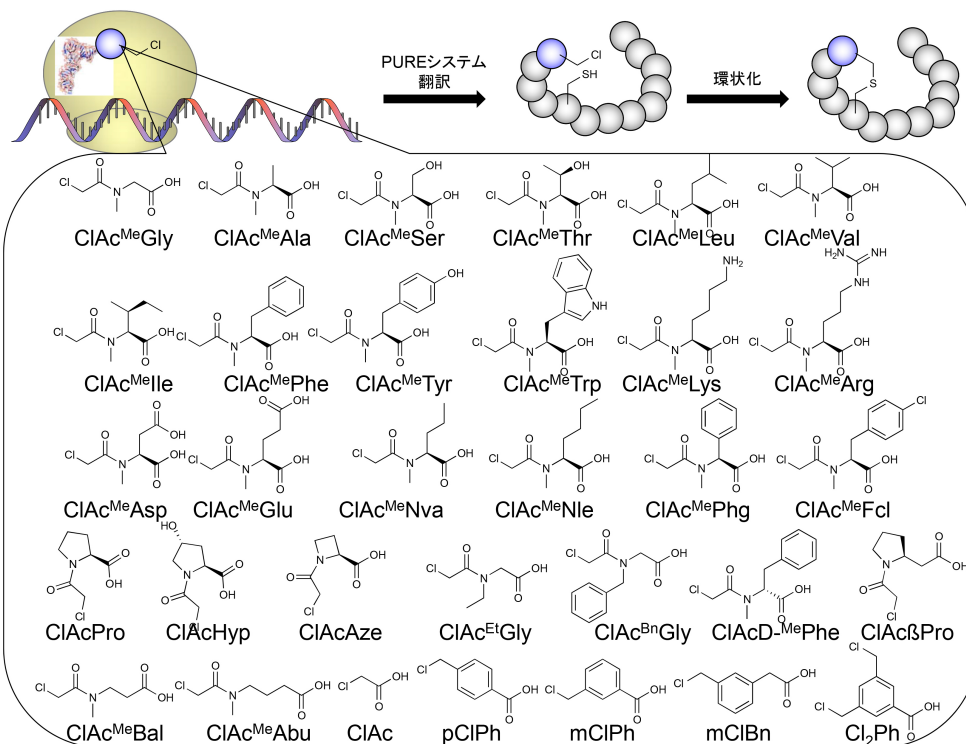


図1. N-アルキルアミノ酸およびアミド基を含まないカルボン酸によるリボソーム翻訳開始とペプチド環状化。

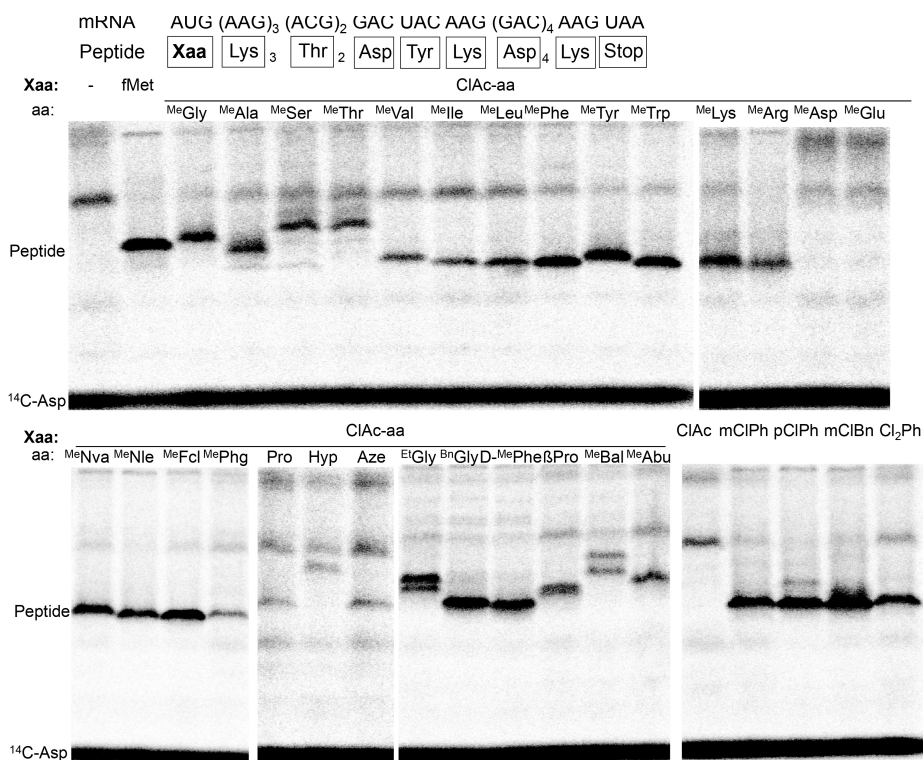


図2. N-アルキルアミノ酸およびアミド基を含まないカルボン酸の翻訳開始効率評価。

同様に、翻訳伸長不可能な D-MePhe による翻訳開始は高効率であった (図 2)。また、N-アルキル β アミノ酸 (BPro, MeBal) や N-アルキル γ アミノ酸 (MeAbu) も翻訳伸長は不可能であったが、翻訳開始は可能であった (図 2)。

結論として、翻訳伸長不可能であったものも含めて、用いた N-アルキルアミノ酸全てで翻訳開始が可能であることが判明し、特に芳香族 N-アルキルアミノ酸による翻訳開始が高効率であることが判明した。

細胞膜透過性の向上のためには、アミド結合を持たないカルボン酸基質による翻訳開始が更に望ましい。従って、まずクロロ酢酸 (ClAc) による翻訳開始を試みたが、その効率は非常に低いものであった (図 2)。芳香族 N-アルキルアミノ酸による翻訳開始が高効率であったため、次に、芳香環のクロロベンジル基を有するカルボン酸 (pClPh, mClPh, mClBn) による翻訳開始を試みた。その結果、アミド結合を持たない、芳香環含有カルボン酸 (pClPh, mClPh, mClBn) であれば高効率に翻訳開始が可能であることが判明した (図 2)。

更に、アミド結合を持たないカルボン酸により翻訳開始・二環状化 (bi-cyclization) をさせる新規の芳香環含有カルボン酸 3,5-bis(chloromethyl)benzoic acid (Cl₂Ph) を合成し、翻訳開始と二環状化を試みた。その結果、Cl₂Ph により翻訳が開始され、二環状化も可能であることが判明した (図 2)。Cl₂Ph による二環状ペプチド無細胞翻訳の優位性を実証するために、この二環状化法を、多種類の N-アルキルアミノ酸による翻訳伸長法と組み合わせた (図 3)。高度 N-アルキル化二環状ペプチドの内部構成 N-アルキルアミノ酸として、azetidine-2-carboxylic acid (Aze) と N-methylphenylalanine (MePhe) を用いた (図 3 b, c)。更に N-メチルシステイン (MeCys) を Cl₂Ph との二環状化に用いた (図 3 b, c)。MALDI-TOF-MS 分析の結果、ポリ N-アルキル二環状ペプチドが PURE システム内で翻訳合成されていることが判明した (図 3 d, e)。

最後に、翻訳開始低効率の ClAc と翻訳開始高効率の Cl₂Ph による mRNA ディスプレイ効率の解析を行った (図 4 a, b)。その結果、ClAc による mRNA ディスプレイは低効率であったが、Cl₂Ph による mRNA ディスプレイ効率は、天然基質の fMet と並ぶ高効率なものであることが判明した (図 4c)。

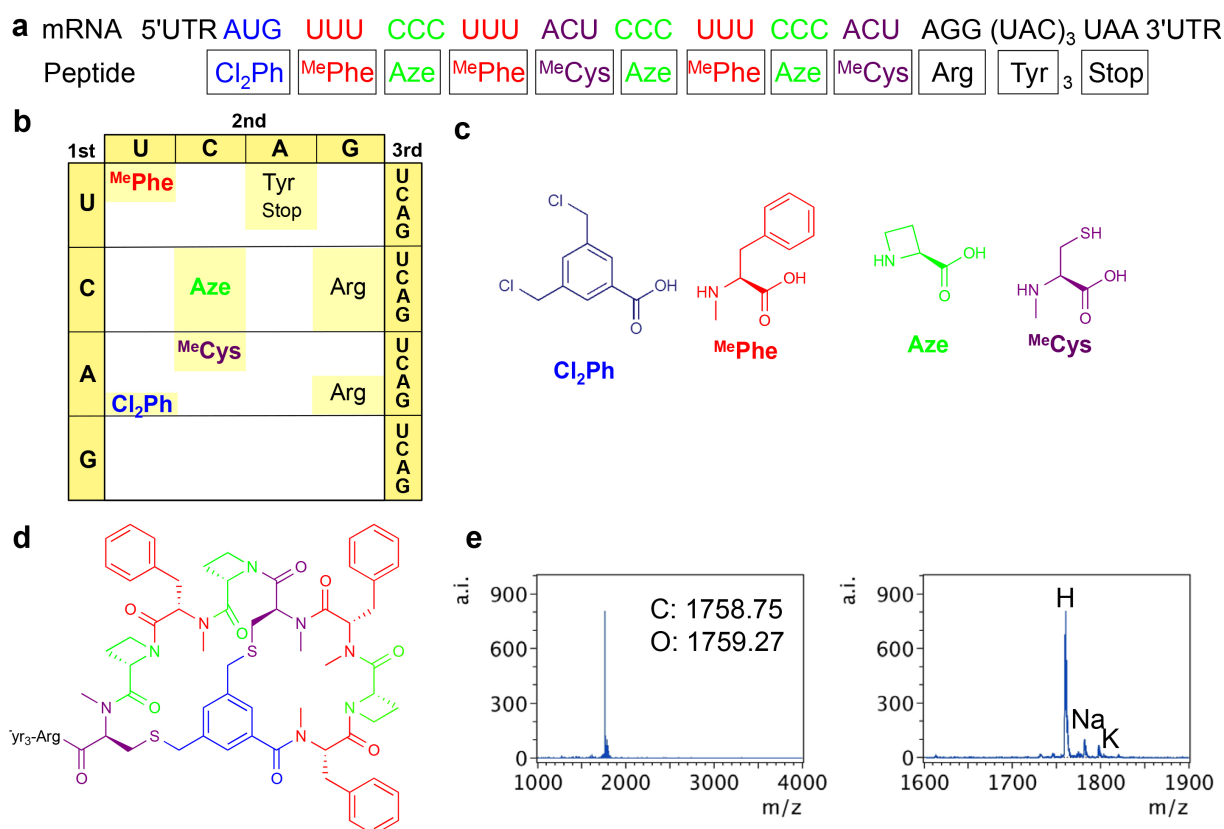


図 3. ポリ N-アルキル二環状ペプチドの翻訳合成。

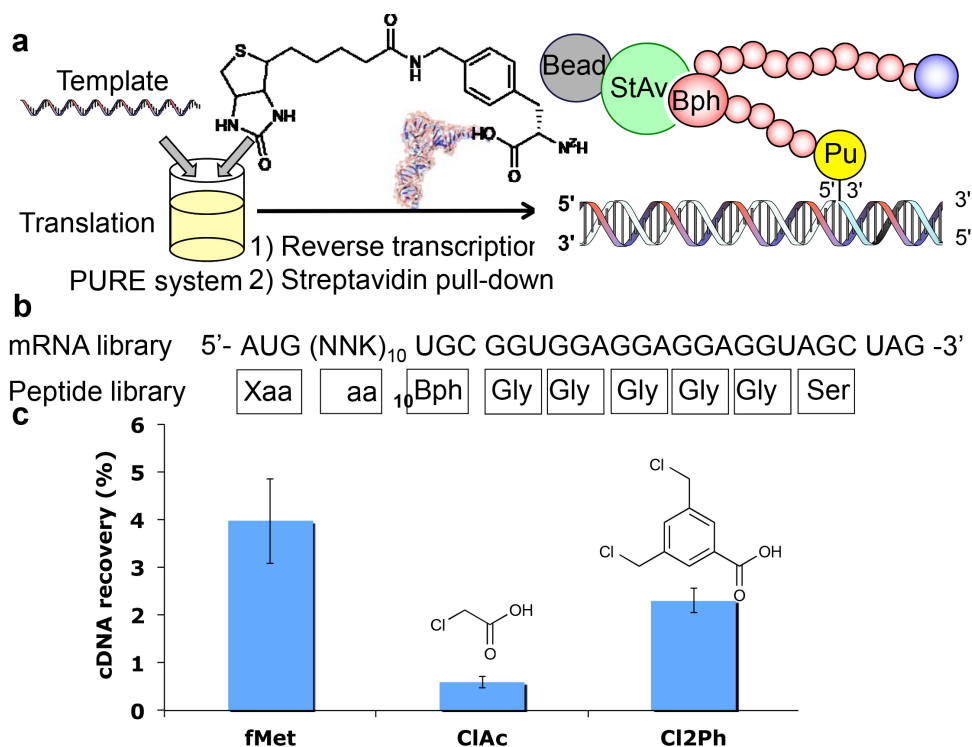


図4. アミド基を含まないカルボン酸により翻訳開始されたペプチドの mRNA ディスプレイ効率。

考 察

以上により、PURE システムを用いることによって、様々な N-アルキルアミノ酸で翻訳開始が可能であることが判明し、特に芳香族 N-アルキルアミノ酸による翻訳開始が高効率であることが判明した。また、アミド結合を持たないカルボン酸により翻訳開始・環状化をさせる新規の芳香環含有カルボン酸群 (pClPh, mClPh, mClBn) の開発に成功した。更に、アミド結合を持たないカルボン酸により翻訳開始・二環状化 (bi-cyclization) をさせる新規の芳香環含有カルボン酸 3,5-bis(chloromethyl)benzoic acid (Cl₂Ph) を開発し、ポリ N-アルキル二環状ペプチドの翻訳合成にも成功した。

今後、本研究で開発した翻訳開始基質により新規のペプチドリガンドが開発され、生きた細胞内に存在する内在タンパク質の解析研究やプロテオミクス研究への応用が期待される⁸⁻¹⁰⁾。

共同研究者

本研究の共同研究者は、産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センターの夏目 徹研究センター長および五島直樹研究チーム長である。また本研究にご支援を承りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kawakami, T., Ishizawa, T. & Murakami, H. : Extensive reprogramming of the genetic code for genetically encoded synthesis of highly N-alkylated polycyclic peptidomimetics. *J. Am. Chem. Soc.*, **135** : 12297-12304, 2013.
- 2) Kawakami, T. & Murakami, H. : Genetically encoded libraries of nonstandard peptides. *J. Nucleic Acids*, **2012** : 713510, 2012.
- 3) Kawakami, T., Ohta, A., Ohuchi, M., Ashigai, H., Murakami, H. & Suga, H. : Diverse backbone-cyclized peptides via codon reprogramming. *Nat. Chem. Biol.*, **5** : 888-890, 2009.

- 4) Kawakami, T., Murakami, H. & Suga, H. : Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids. *J. Am. Chem. Soc.*, **130** : 16861-16863, 2008.
- 5) Kawakami, T., Murakami, H. & Suga, H. : Messenger RNA-programmed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides. *Chem. Biol.*, **15** : 32-42, 2008.
- 6) Kawakami, T., Sasaki, T., Reid, P. C. & Murakami, H. : Incorporation of electrically charged N-alkyl amino acids into ribosomally synthesized peptides via post-translational conversion. *Chem. Sci.*, **5** : 887-893, 2014.
- 7) Kawakami, T., Ishizawa, T., Fujino, T., Reid, P. C., Suga, H. & Murakami, H. : *In vitro* selection of multiple libraries created by genetic code reprogramming to discover macrocyclic peptides that antagonize VEGFR2 activity in living cells. *ACS Chem. Biol.*, **8** : 1205-1214, 2013.
- 8) Kawakami, T., Cheng, H., Hashiro, S., Nomura, Y., Tsukiji, S., Furuta, T. & Nagamune, T. : A caged phosphopeptide-based approach for photochemical activation of kinases in living cells. *ChemBioChem*, **9** : 1583-1586, 2008.
- 9) Jablonski, A. E., Kawakami, T., Ting, A. Y. & Payne, C. K. : Pyrenebutyrate leads to cellular binding, not intracellular delivery, of polyarginine-quantum dots. *J. Phys. Chem. Lett.*, **1** : 1312-1315, 2010.
- 10) Kawakami, T., Adachi, S., Ogawa, K., Hatta, T., Kubo, T., Goshima, N. & Natsume T. : Proteomic mapping of biological complexes using directed ligand evolution and ultra-high sensitive mass spectrometry. *Pept. Sci.*, **2014** : 339-340, 2015.