

- Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C et al (2006) Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9912–9917
- Dean M, Fojo T, Bates S. (2005) Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5:275–284
- Dome B, Timar J, Ladanyi A et al (2009) Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 69:108–124
- Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D et al (2009) Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol* 131:115–127
- Dunsford HA, Sell S. (1989) Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res* 49:4887–4893
- Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J et al (1998) Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 30:459–466
- Fan J, Li R, Zhang R et al (2007) Effect of Bcl-2 and Bax on survival of side population cells from hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 13:6053–6059
- Fausto N. (2004) Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39:1477–1487
- Fialkow PJ. (1976) Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458:283–321
- Gangenahalli GU, Singh VK, Verma YK et al (2006) Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev* 15:305–313
- Gilyarov A.V. (2008) Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38:165–169
- Goodell MA, Brose K, Paradis G et al (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183:1797–1806
- Graf T, Stadtfeld, M. (2008) Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell Stem Cell* 3:480–483
- Hanahan D, Weinberg, RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
- Herlyn M, Steplewski Z, Herlyn D et al (1979) Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1438–1442
- Hu C, Li H, Li J et al (2008) Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling. *Carcinogenesis* 29:2289–2297
- Hugo H, Ackland ML, Blick T et al (2007) Epithelial – mesenchymal and mesenchymal – epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213:374–383
- Inada M, Follenzi A, Cheng K et al (2008) Phenotype reversion in fetal human liver epithelial cells identifies the role of an intermediate meso-endodermal stage before hepatic maturation. *J Cell Sci* 121:1002–1013
- Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M et al (2007) Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 45: 1462–1470
- Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E et al (2004) Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am J Pathol* 164:1347–1359
- Jordan CT, Guzman ML, Noble, M. (2006) Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355:1253–1261
- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y et al (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18:2127–2136
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP et al (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557–563
- Khurana S, Mukhopadhyay, A. (2008) Hematopoietic progenitors from early murine fetal liver possess hepatic differentiation potential. *Am J Pathol* 173:1818–1827
- Kinoshita T, Miyajima, A. (2002) Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592:303–312
- Koenig S, Probst I, Becker H et al (2006) Zonal hierarchy of differentiation markers and nestin expression during oval cell mediated rat liver regeneration. *Histochem Cell Biol* 126:723–734

- Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A et al (2007) CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:410–417
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS et al (2008) The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47:1994–2002
- Lessard J, Sauvageau, G. (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423:255–260
- Li L, Krantz ID, Deng Y et al (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16:243–251
- Limaye PB, Bowen WC, Orr AV et al (2008) Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated and epidermal growth factor-mediated signaling in transdifferentiation of rat hepatocytes to biliary epithelium. *Hepatology* 47:1702–1713
- Lozier J, McCright B, Gridley, T. (2008) Notch signaling regulates bile duct morphogenesis in mice. *PLoS ONE* 3:e1851
- Ma S, Chan KW, Hu L et al (2007) Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132:2542–2556
- Ma S, Chan KW, Lee TK et al (2008a) Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res* 6:1146–1153
- Ma S, Lee TK, Zheng BJ et al (2008b) CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 27:1749–1758
- Maetzel D, Denzel S, Mack B et al (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11:162–171
- Mani SA, Guo W, Liao MJ et al (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704–715
- Masson NM, Currie IS, Terrace JD et al (2006) Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G45–54
- Michalopoulos GK, Barua L, Bowen WC. (2005) Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury. *Hepatology* 41:535–544
- Mishra L, Banker T, Murray J et al (2009) Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49:318–329
- Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ et al (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68:4331–4339
- Mizrak D, Brittan M, Alison M.R. (2008) CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214:3–9
- Morel AP, Lievre M, Thomas C et al (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 3:e2888
- Murry CE, Keller, G. (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132:661–680
- Niki T, Pekny M, Hellems K et al (1999) Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29:520–527
- Nitou M, Sugiyama Y, Ishikawa K et al (2002) Purification of fetal mouse hepatoblasts by magnetic beads coated with monoclonal anti-e-cadherin antibodies and their in vitro culture. *Exp Cell Res* 279:330–343
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S et al (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106–110
- Ober EA, Verkade H, Field HA et al (2006) Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification. *Nature* 442:688–691
- Oda T, Elkahoul AG, Pike BL et al (1997) Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16:235–242
- Oertel M, Menthena A, Chen YQ et al (2007) Comparison of hepatic properties and transplantation of Thy-1(+) and Thy-1(-) cells isolated from embryonic day 14 rat fetal liver. *Hepatology* 46:1236–1245
- Oertel M, Menthena A, Chen YQ et al (2008) Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver. *Gastroenterology* 134:823–832
- Oertel M, Shafritz DA. (2008) Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 1782:61–74

- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN et al (1997) Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 151:1273–1280
- Potter VR. (1978) Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture. *Br J Cancer* 38:1–23
- Rege TA, Hagood JS. (2006) Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 1763: 991–999
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E et al (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445:111–115
- Roskams T, Cassiman D, De Vos R et al (2004a) Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 280:910–923
- Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. (2003) Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 23:385–396
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C et al (2004b) Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39:1739–1745
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL et al (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15:1998–2009
- Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. (2006) The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 24:1852–1858
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A et al (2007) Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204:1973–1987
- Sell S. (1993) Cellular origin of cancer: dedifferentiation or stem cell maturation arrest? *Environ Health Perspect* 101 (Suppl 5):15–26
- Sell S. (2002) Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell Dev Biol* 13:419–424
- Sell S. (2003) The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35:267–271
- Shi GM, Xu Y, Fan J et al (2008) Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 1155–1163
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396–401
- Sjjoblom T, Jones S, Wood LD et al (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268–274
- Slack JM. (2008) Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 322:1498–1501
- Strain AJ, Crosby HA, Nijjar S et al (2003) Human liver-derived stem cells. *Semin Liver Dis* 23:373–384
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H et al (2006) Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351:820–824
- Suzuki A, Sekiya S, Onishi M et al (2008) Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48:1964–1978
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M et al (2007a) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2:3081–3089
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al (2007b) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872
- Takaishi S, Okumura T, Wang TC. (2008) Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol* 26:2876–2882
- Tanimizu N, Miyajima, A. (2004) Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 117:3165–3174
- Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H et al (2003) Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116:1775–1786
- Turley EA, Veisheh M, Radisky DC et al (2008) Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol* 5: 280–290

- Van Den Heuvel MC, Slooff MJ, Visser L et al (2001) Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* 33:1387–1393
- Visvader JE, Lindeman GJ. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8:755–768
- Vogelstein B, Kinzler KW. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10: 789–799
- Wauthier E, Schmelzer E, Turner W et al (2008) Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods Cell Biol* 86:137–225
- Weiss TS, Lichtenauer M, Kirchner S et al (2008) Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Gut* 57:1129–1138
- Went P, Vasei M, Bubendorf L et al (2006) Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 94:128–135
- Wicha MS, Liu S, Dontu, G. (2006) Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66:1883–1890; discussion 1895–1886
- Wood LD, Parsons DW, Jones S et al (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318:1108–1113
- Wu C, Alman BA. (2008) Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 268:1–9
- Yamashita T, Budhu A, Forgues M et al (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67:10831–10839
- Yamashita T, Forgues M, Wang W et al (2008) EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 68:1451–1461
- Yamashita T, Ji J, Budhu A et al (2009) EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology* 136:1012–1024
- Yang W, Yan HX, Chen L et al (2008a) Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 68:4287–4295
- Yang ZF, Ho DW, Ng MN et al (2008b) Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 13:153–166
- Yang ZF, Ngai P, Ho DW et al (2008c) Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 47:919–928
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et al (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002–5012
- Yin S, Li J, Hu C et al (2007) CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 120:1444–1450
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H et al (2008) Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47:636–647
- Zaret KS, Grompe, M. (2008) Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322:1490–1494
- Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S et al (2007) Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 170:1750–1762
- Zender L, Spector MS, Xue W et al (2006) Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125:1253–1267
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7:1028–1034
- Zou G.M. (2008) Cancer initiating cells or cancer stem cells in the gastrointestinal tract and liver. *J Cell Physiol* 217:598–604

擬天然物特殊ペプチドの プログラム翻訳合成と応用

樋口 岳
菅 裕明*

*Programmed Synthesis of Natural Product-like Non-standard Peptides
Using the Translation System and Its Application*

Takashi Higuchi and Hiroaki Suga*

The translation machinery is generally designated to synthesize polypeptides consisting of 20 proteinogenic (natural) amino acids. Significantly, the ribosomal synthesis is employed in mRNA-template dependent manner, i.e. the sequence of mRNA dictates that of polypeptide according to the genetic code, enabling us to design the peptide sequence by simply preparing the corresponding mRNA or its DNA as the template for transcription. From the synthetic point of view, however, the fact that the useable monomers are limited to 20 proteinogenic amino acids is a serious restriction for the preparation of peptide library with high chemical diversities. In this review, we shall discuss an emerging new technology, referred to as genetic code reprogramming, that allows us to express natural product-like non-standard peptides using a reconstituted cell-free translation system. This technology will open a new avenue for the discovery of a new class of non-standard peptides.

Key words: natural product, peptide, ribozyme, cell-free translation, genetic code reprogramming, drug discovery, in vitro selection

はじめに

有機合成化学の始まりともいえる、Wöhlerによる尿素合成法の発見や Kolbe による酢酸合成法の確立以来、様々な概念や戦略の下、優れた不斉反応の開発や難攻不落と思われた天然物合成の達成など、有機合成化学は大きな発展を遂げてきた。とりわけ、この四半世紀に注目すると、この間の有機合成化学の進歩には、有機金属化学の貢献が大きいといえる。無機化学と手を取り合うことによって生まれた、この学問から創造される概念は、合成戦略を一新することになった。その一方で、有機合成化学は生物学との融合領域へと進化を遂げる必要性にも迫られている。いわゆるケミカルバイオロジーと呼ばれる分野である¹⁾。

現在の分子生物学や細胞生物学を支えているのは、遺伝子操作に立脚したバイオテクノロジーといえる。例えば、試験管内で DNA を容易に増幅させる PCR: Polymerase Chain Reaction や RNA から相補鎖 DNA を導く

逆転写など、核酸を取り扱う基礎技術は、極めて簡便な手法として確立されている。また、翻訳合成は、メッセンジャー RNA (mRNA: messenger RNA) の核酸情報を利用した他に類をみない合成系である。塩基配列をデザインするだけで、化学構造の全く異なったアミノ酸からポリペプチドを形成させることが可能である。

近年の生命科学分野の発展は目覚ましく、翻訳合成に必要な分子群や、そのシステムの詳細が解明されつつあるばかりでなく、理解を礎とした工学的な応用をも可能になってきた。我々は、このシステムに有機化学的なエッセンスを加えることで、通常の翻訳合成では困難であった、20 種類のタンパク質性アミノ酸²⁾ 以外の合成素子がペプチド鎖に導入された「特殊ペプチド」の翻訳合成技術の開発に成功した。この技術の最大の強みは、mRNA を設計図として特殊ペプチドが簡便に調製できる点にある。その結果、天然物に見出されるような大環状ペプチドの合成や、「擬天然物」特殊ペプチドライブラリーの構築が可能となった。さらに、この技術が無細胞ディスプレイと組み合わせることで、 10^{13} にも及ぶ高い多様性をもつ特殊ペプチドライブラリーからの迅速なスクリーニングも可能となった。本総合論文では、上記の一連の技術開発に至った歴史的背景、およびこれまでの成果を総括的にまとめ、将来ビジョンを論じたい。

* 東京大学先端科学技術研究センター(153-8904 東京都目黒区駒場 4-6-1)

* Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo (4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904)

1. リボソーム翻訳合成

1.1 遺伝暗号に基づいた核酸情報の変換

ペプチドのアミノ酸配列をはじめ、DNA に記録されている情報はアデニン、グアニン、シトシン、チミン、これら4種類からなる塩基の組み合わせによって構成されている。鋳型となるDNAの塩基配列に対応したmRNAが形成されると、その情報に基づいた翻訳合成がリボソームにおいて行われる。こうして、様々なアミノ酸の組み合わせからなるタンパク質やペプチドが合成される。このとき、たった4種類の塩基によって20種類からなるアミノ酸を暗号化させなければならない。そこで、3塩基を組み合わせると1つのアミノ酸を定義させている。すなわち、 $[4\text{つの塩基種}]^3 = 4 \times 4 \times 4 = 64$ 通りの暗号の中に20種類のアミノ酸を対応させているのである。この3塩基の組み合わせはコドンと呼ばれており、アミノ酸との対応関係は表1のような遺伝暗号(genetic code)として知られている。例えば、アラニン(Ala)を定義するコドンはGCU, GCC, GCA, GCGとなる。mRNAを構成する塩基の羅列は、これらコドンの集合体とみることができる。この「法律」に従って、遺伝暗号が翻訳されているのである。

Table 1 Genetic code.

		2nd					
1st	U	C	A	G	3rd		
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U	A	
	Leu		Stop	Stop	A		
C	Leu	Pro	His	Arg	U	G	
			Gln		C		
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U	C	
	Met		Lys	Arg	A		
G	Val	Ala	Asp	Gly	U	G	
			Glu		C		

これらのコドンの組み合わせに基づいた翻訳合成が図1のプロセスによって行われる。すなわち、(1)mRNA上のコドンに対応した、アミノ酸を含む複合体が取り込まれる。(2)先に取り込まれていたアミノ酸との間でアミド結合が形成される。(3)次のアミノ酸が取り込まれる。こうして次々とアミド結合が形成されることによって、塩基配列の情報がアミノ酸配列へと翻訳されていき、ポリ

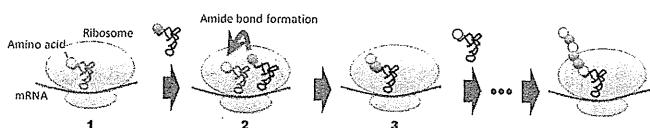


Fig. 1 Ribosomal translation.

ペプチドは合成される。つまりコドンの解読とアミド結合形成とは連動して行われていることになる。

1.2 tRNAによる暗号解読システム

この暗号解読とアミド結合形成が行われる際、トランスファーRNA (tRNA: transfer RNA) と呼ばれるRNAも重要な役割を担っている。80塩基程度からなる各tRNAは、クローバー型の2次構造(図2右)を有しており、これが折りたたまれることによって、L字型の3次構造を形成している(図2左)。その3'末端には共通したCCAという配列を持ち、アンチコドンループ部位にはアンチコドンと呼ばれる、様々な3塩基の組み合わせからなるコドン認識領域が位置している。

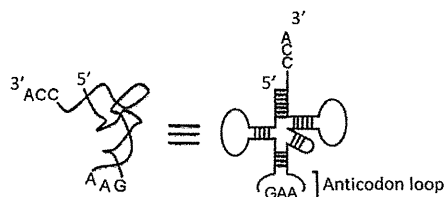


Fig. 2 Structure of tRNA.

これらのtRNAはmRNAのようにアミノ酸配列の情報を持っているわけではない。その代わりに、コドン(遺伝暗号)とアミノ酸(暗号の答え)との対応づけを行っている。すなわち、遺伝暗号の「法律」に従って、特定のtRNAの3'末端に位置する水酸基と、特定のアミノ酸とが、エステル結合によって連結されているのである。こうして、いわゆるアミノアシル-tRNA(aa-tRNA: aminoacyl-tRNA)と呼ばれる、遺伝暗号とその答えからなる複合体が形成されている。一方、アンチコドン領域では、mRNA上のコドンと、アデニンとウラシル(AとU)、もしくはグアニンとシトシン(GとC)といった相補鎖がリボソーム内で組まれるように設計されており、この相補鎖形成によって、分子認識が行われる。すなわち、リボソームへaa-tRNAが取り込まれたとき、幸運にもmRNAとaa-tRNAとの間に、相補的な塩基対形成が可能である場合に限って、外部へ排除されることなくこの分子はリボソーム内に留まることが許される。その結果、特定のaa-tRNAのみがすでに取り込まれている、もう1分子のaa-tRNAのエステルの位置へ近づくことができ、そこへアミノ基が攻撃することによって、アミド結合が導かれているのである。

こうして、ひとたびアミド結合が形成された後、転じてaa-tRNAは求電子剤となり、そのtRNA部位は脱離基となる。この繰り返しによってペプチド鎖が伸長していく(図3)。

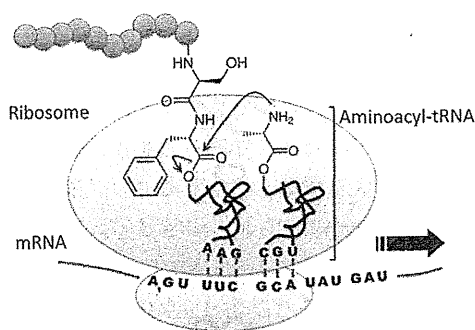


Fig. 3 Amide bond formation in ribosome.

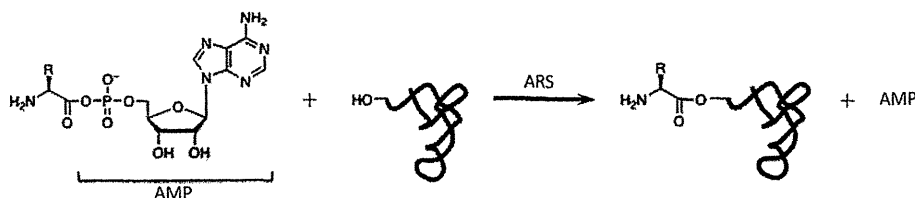
1.3 アミノアシル化酵素(ARS : Aminoacyl-tRNA Synthetase)

このようなメカニズムでペプチド鎖が伸長することから、正確な遺伝暗号の翻訳を行うためには、各 tRNA とアミノ酸による、正しい組み合わせの aa-tRNA が重要である。この結合形成の鍵となる酵素がアミノアシル-tRNA シンセターゼ(ARS : Aminoacyl-tRNA Synthetase)である。この酵素は、アミノ酸と AMP : adenosine 5'-monophosphate からなるエステルと、tRNA の 3'末端に位置する水酸基とのエステル交換反応を基質特異的に触媒し、aa-tRNA へと誘導する(スキーム 1)。つまり、ARS が行うアミノ酸および tRNA に対する厳格な認識によって、核酸情報に忠実な翻訳反応が行われているのである。

2. 遺伝暗号改変による非タンパク質性アミノ酸・非天然アミノ酸の導入

2.1 “Flexible” なアミノアシル化酵素が可能とすること

逆に、ARS が遺伝暗号のルールという束縛を受けず触媒作用のみを有すると、どうなるであろうか。つまり、ARS の機能に一般性を与え、tRNA とアミノ酸であれば aa-tRNA を導くことが可能になった場合である。もちろん、生体内でこのようなことが起これば遺伝情報が何の意味もなさなくなってしまう。しかし、通常では形成不可能な様々な aa-tRNA を人工的に構築させることによって、生物の支配下にあった遺伝暗号を創り変えることが可能になるのではなかろうか。



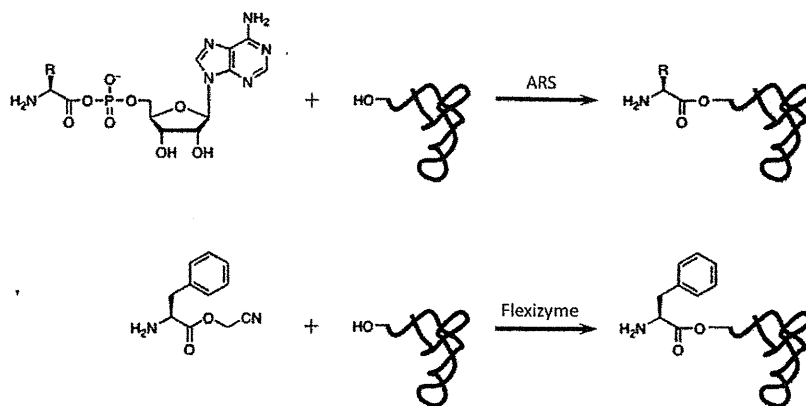
Scheme 1 Generation of aminoacyl-tRNA by transesterification reaction.

たとえ aa-tRNA を構成するアミノ酸と tRNA の組み合わせが遺伝暗号に従っていなくても、要はリボソーム内において、mRNA 上のコドンと aa-tRNA のアンチコドンループ部位の間に相補的な塩基対を形成させることさえできればよいのである。こうしてリボソーム内に留めることができれば、特定の aa-tRNA のアミノ基を反応点へと誘導させることが可能になり、アミド結合が形成されるのではないか。もしそのとおりになれば、タンパク質性アミノ酸に限定されることなく、翻訳システムを利用することができるかもしれない³⁾。そこで、一般性をもって aa-tRNA を構築させる新しい ARS の開発を行うこととした。人工的に酵素を創り出す試みである。

2.2 アミノアシル化触媒“フレキシザイム”の発見と、その一般性への挑戦

ところで現存の生物は、主に DNA, RNA, そしてタンパク質から構成されており、DNA や RNA が遺伝情報を担当し、タンパク質が主に酵素反応等の機能を有している。しかし、1980 年代初頭、Cech らによる触媒活性をもつ RNA (リボザイム) の発見⁴⁾によって、RNA は遺伝情報と機能をともに備え得ることが示された。それ以来、RNA のみからなる世界が生命の起源だったのではないか、という説が支持されるようになってきている。この、いわゆる RNA world 仮説⁵⁾によれば、原始生命体はすべて RNA のみから構成されており、長い年月の経過とともに、それらの RNA の機能は、より複雑な機能の獲得が可能であり、かつ比較的安定なタンパク質へと移行したとされている。この説から察するに、ARS も現在のような 20 種類のアミノ酸を合成素子として構成されるタンパク質ではなく、4 種類のリボヌクレオチドからなる RNA であった可能性がある。ともすれば、すでに化石となってしまった ARS の機能をもつ RNA 触媒を人工的に復元できるのではないか、こう期待した。

RNA のみからなる分子であれば、その探索に試験管内分子進化法を利用することができる。この方法論の詳細については他に譲るものとするが⁶⁾、一言でいえば「大多数の分子群から、優れた分子のみが生き残れる」という戦略である。すなわち、ランダムな 4 塩基の配列の



Scheme 2 Aminoacylation catalyzed by ARS or flexizyme.

組み合わせから触媒活性のある配列群を選択する。その塩基配列を PCR によって増幅させ、活性をもつ配列の存在比を増やす。その中から再び触媒活性をもつ配列群を選択して、再び PCR により増幅させる。この一連の操作を繰り返すことによって、優れた活性を有する塩基配列のみが系内に得られてくる、という方法論である。

しかし、どのような手段であったとしても、まったく新しい触媒をそうやすやすと生み出せる訳ではない。ましてや、溶媒は水(緩衝液)に限定されるばかりか、その中には様々な夾雑物が混在する。さらにその基質である tRNA も、触媒となるリボザイムでさえもリボヌクレオチドから構成されているのだから、系中には大量の水酸基が存在することになる。この中から、tRNA の 3' 末端に位置するリボースの水酸基だけを見つけ出して、アシル化を触媒する分子など、はたして得られるのであろうか。

実際にこのアシル化触媒の開発は困難を極めた。たとえ tRNA とのエステルが得られた場合であっても、その詳細を調べてみると選択性はなく、他の水酸基の位置がアシル化されていただけであった。しかし、この試行錯誤の中、ビオチンによってラベル化されたフェニルアラニンのシアノメチルエステルを用いた探索戦略から、tRNA 上のあらゆる水酸基のなかで 3' 末端の水酸基のみを選択的にアシル化させるリボザイムが得られたのであった。これはまさしく試験管内分子進化という手法を用いたセレネディピティーから生まれた幸運であった⁷⁾。

我々はここを突破口として、このリボザイムのさらなる進化を行った。そしてついに、いかなるアンチコドンをもつ tRNA であっても、フェニルアラニンとのエステル結合を形成させることのできるリボザイムの獲得に成功した⁸⁾。こうして得られたリボザイムの機能は、基質の認識以外は ARS と類似している。すなわち、ARS は遺伝暗号のルールの下、エステル交換反応を触媒して、アミノ酸の AMP エステルから aa-tRNA を導く。

それに対し、このリボザイムはアミノ酸側鎖の芳香環を認識し、あらかじめカルボン酸をシアノメチルエステルとして、弱く活性化させておいた位置のエステル交換反応を触媒することにより、aa-tRNA へと導く。従って、天然に存在しないアミノ酸であっても側鎖に芳香環をもつ基質であれば、リボザイムが触媒するエステル交換反応によって結合構築が可能なのである(スキーム 2)。

さらに、我々はこの触媒機能に一般性を求めた。その戦略として、芳香環を基質認識部位とするリボザイムの構造に基づき、側鎖に芳香環を持たないアミノ酸であっても aa-tRNA へと導くリボザイムの獲得を図る、とい

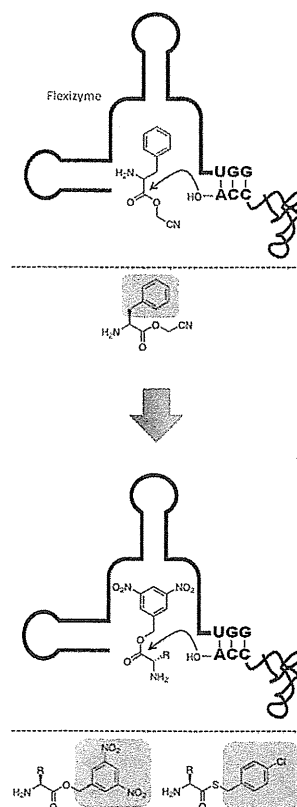


Fig. 4 Development of leaving group recognition flexizyme system.

う方法を採用した。これは一見すると矛盾しているようであるが、あらゆるアミノ酸が芳香環を認識するリボザイムの基質となる方法が存在する。エステル交換反応の脱離基の位置に芳香環を配置させればよいのだ。この戦略のもと、新しいリボザイムと脱離基の探索を行ったところ、3,5-ジニトロベンジルアルコール、もしくは

-クロロベンジルスルフィドからなるアミノ酸エステルを基質として、aa-tRNAを構築させる方法を開発することができた(図4)。こうして、すべてのタンパク質性アミノ酸はもちろん、他のアミノ酸についても、簡便にaa-tRNAへと導くことが可能となった。Flexibleなribozyme = "Flexizyme" システムの誕生である⁹⁾。

2.3 遺伝暗号のリプログラミング

このフレキシザイム技術によって人工的に調製されたaa-tRNAを翻訳系へ添加すれば、リボソームの行う翻訳反応機構のもと、望みのアミノ酸がペプチドへ組み込まれる。こうして、生物が築き上げた遺伝暗号の呪縛から解放されたはずであった。しかし、遺伝暗号を自在に書き換えるにはもう1つ解決すべき課題があったのである。

各々のコドンにはすでにアミノ酸が割り当てられているため、調製されたaa-tRNAだけが利用できるコドンが存在しない。それゆえに、このaa-tRNAを翻訳系へ添加することは、1つの暗号に2つの答えができることを意味する。これでは「競合反応」が起こってしまうのである。しかし、この問題を打破することができる。2001年に清水、上田らによって開発されたprotein synthesis using recombi-

nant element (PURE) system¹⁰⁾である。このシステムは、翻訳に必要な最低限の構成要素を組み合わせ、人工的に再構築された翻訳系である。すなわち、細胞から単離、精製されたりボソームやtRNA、そして一部のタンパク質などと、「反応剤」となるアミノ酸やATPなどのエネルギーソースを、まるで合成反応を行うかのように混合すると、それだけで翻訳系が構築されるのである。清水、上田らは、こうすることで翻訳系が機能することを証明したのだが、我々が注目したことはこれらの構成要素が欠けると機能しなくなる、という点であった。

さて、1つのコドンを2つのアミノ酸で取り合うような、競合反応を抑制するにはどうするべきであろうか。このPURE systemから余計な反応剤を除いてしまえばよい。つまり、元来その位置のコドンが指定されていたタンパク質性アミノ酸の添加をやめることによって、導入したいアミノ酸のみが割り当てられたコドンをつくるのである。このような翻訳系を、アミノ酸あるいは他の構成要素を取り除いた(withdrawn)という意味から我々は*withdrawn PURE (wPURE) system*と名づけた。任意のコドンのリプログラミングは以下のように行う(図5)。例えば、スレオニン(Thr)のコドンを利用して他のアミノ酸を導入したい場合、反応剤となるThrを加えなければ、このアミノ酸がaa-tRNAとなる反応は進行しない。すると、この位置にはアミノ酸を何も認識しない「空コドン」が形成される。すなわち、ACX(X = A, G, C, U)の部分では既存のコドンとアミノ酸との対応関係が解消されるのである。そこへ、このコドンを認識する

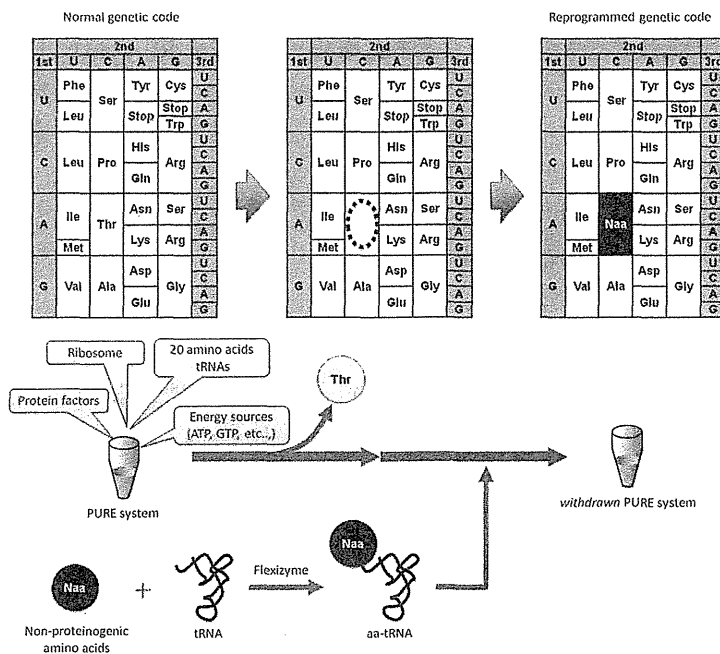


Fig. 5 Genetic code reprogramming by using flexizyme technology and *withdrawn PURE system*.

tRNA と導入したいアミノ酸からなる aa-tRNA を、前もってフレキシザイムを用いて調製し、添加する。こうして、初期化されていたコドン-アミノ酸の対応関係を人工的に再構築することができる。ついに、望みの位置の遺伝暗号を初期化して別のアミノ酸の遺伝暗号へと改変すること、すなわち、遺伝暗号のリプログラミングに至ったのである⁹⁾。

2.4 非天然アミノ酸のペプチドへの導入

このリプログラミング技術を用いることによって、簡単に特殊ペプチドが得られるようになった。実は、リボソームの行う翻訳反応機構は、タンパク質性のアミノ酸以外もある程度許容したのである^{11,12,15-17)}。その一部を図6に示した。

例えば、メチル、アセチル化など様々に修飾されたリシン誘導体をペプチドへ直接導入させることが可能になった(図6-1)¹²⁾。ヒストンと呼ばれるタンパク質のN末端側には、ヒストンテールと総称される直鎖状の構造が存在する。このヒストンタンパク質が翻訳された後、このテール部位に含まれるリシン側鎖への特徴的な修飾が行われる。その様々な修飾パターンがまさに暗号となってDNAの転写制御を調節している、ということが明らかになってきたものの¹³⁾、これらのペプチド群を

得ることは容易ではなかったため、その転写制御機構の解明は困難であった。しかし、リプログラミング技術を用いて、タンパク質性アミノ酸の遺伝暗号の中にこれらのリシン誘導体を組み込んでおけば、それぞれの非タンパク質性アミノ酸に対応するコドンを翻訳させるだけで、簡単にリシン誘導体を含む特殊ペプチドを得ることが可能になった。

また、アルキニル基とアジド基とを別々にもつ2つの非天然アミノ酸をペプチド鎖へと導入させることにより、Click 反応¹⁴⁾を利用してトリアゾール構造を構築させることができた(図6-2)¹⁵⁾。このとき用いられる2つの官能基は他のタンパク質性アミノ酸の側鎖とは反応しないことから、特異的にこれら同士を結合させることが可能である。

さらに、単純なアミド結合とは異なる主鎖構造であっても翻訳系は機能し、核酸情報に忠実な翻訳がなされた^{16,17)}(図6-3, 4)。すなわち、アミノ酸のアミノ基が水酸基に置き換わった分子を、非天然アミノ酸とみなし導入すれば、ポリエステルが得られ、*N*-メチル化アミノ酸を同様に用いれば、プロテアーゼ耐性を有する *N*-メチル化アミド構造が得られた。

なお、我々の用いている翻訳合成系では、穏和な条件

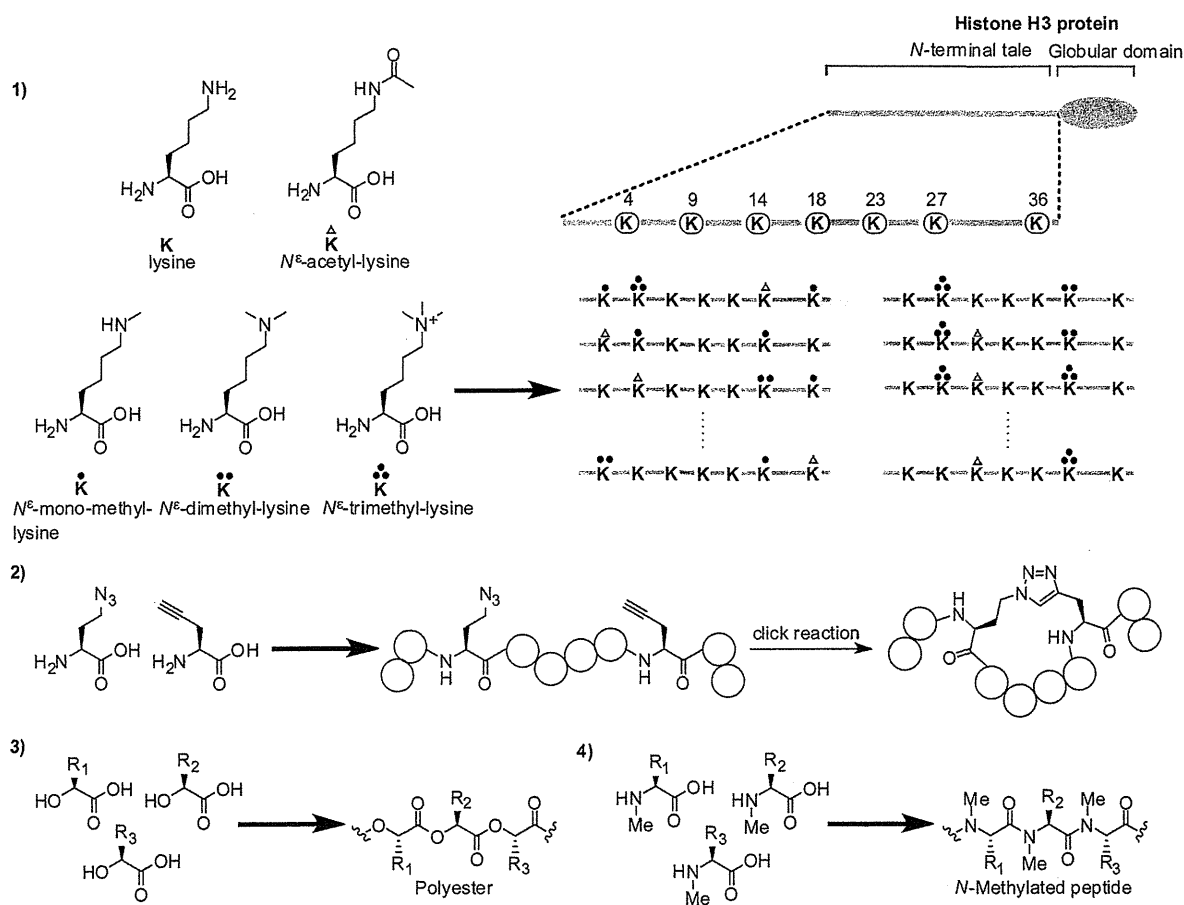


Fig. 6 Incorporation of various non-proteinogenic amino acids to peptides.

に付す(37℃, 30分)ことによって, 1–10 μM 程度のペプチドが得られることから, 通常 10–100 μl のスケールでこれらの翻訳合成を行っている。

巨大なタンパク質であっても核酸情報に従って忠実に築きあげる厳密さと, タンパク質性アミノ酸に限定されず, 基質とみなすことのできる寛容さの二面性を, 翻訳合成機構がもちあわせていることは特筆すべき点である。

3. 非天然アミノ酸導入技術の応用

3.1 創薬リード化合物を指向した「擬天然物」ライブラリーの設計へ向けて

このような翻訳機構を利用して形成される化合物ライブラリーの強みは, 高多様性のペプチドライブラリー構築が簡便であること, およびそのライブラリーのスクリーニングが比較的容易であることである。すなわち, mRNA の核酸情報を翻訳するだけで, 通常の化学合成では調製困難な 10^{13} もの多様性をもつライブラリーが一挙に得られる。さらに, そのライブラリーへ進化分子工学に基づいたスクリーニング法を適用させることによって, 迅速な評価が可能である¹⁸⁾。ゆえに, 創薬リード化合物の探索には魅力的な方法論かと思われるものの, こうして得られるライブラリーは, タンパク質性アミノ酸から構成される直鎖ペプチドに限られるところに難点があった。これらのペプチドは生体内での安定性に欠けることから薬剤としての効果が低い場合が多いからである。

一方で, 天然物から得られるペプチドには, 薬剤として貢献している分子も存在する。これらの生理活性分子には cyclosporin A (図7) のような環状構造がよくみられる。環状化することによってプロテアーゼへの安定性を獲得しており, さらに, 直鎖構造と比較して, より剛直な構造をとることから, 生体分子への高い親和性をもつものと考えられている。そこで, 我々の開発したリプログラミング技術を駆使して, 翻訳合成された様々な特殊ペプチドを環状化させることができれば, 生理活性天

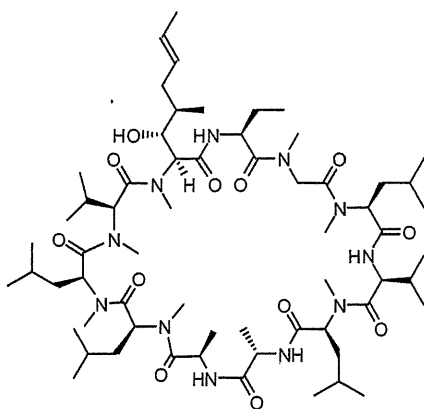


Fig. 7 Cyclosporin A.

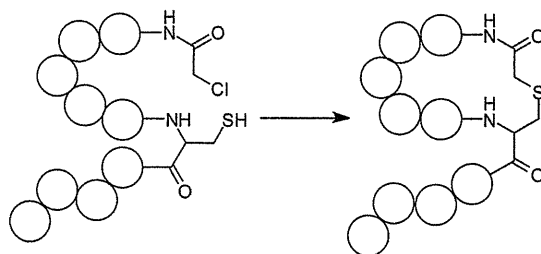
然物として単離されるような特殊ペプチド「擬天然物」を含むライブラリーが構築でき, その中から生理活性分子のスクリーニングが可能になると考えた。

3.2 環状ペプチド構築法

擬天然物ライブラリーを構築する上で適切な環化法, すなわち, 翻訳系という反応条件下, 環形成が速やかに進行し, 続くスクリーニングへの影響が小さいと考えられる方法について, 2つ紹介したい。

3.2.1 α-クロロアセトアミド構造とチオールによる環構築法

α-クロロアセトアミド構造を含む非天然アミノ酸とシステインを同一ペプチド中に導入しておく, 翻訳合成の条件下, これらの間で速やかに結合が形成され, 環構造が構築される (スキーム3)¹⁹⁾。この反応の興味深いところは, 高い選択性を有していることである。α-クロロアセトアミド構造は, 同一ペプチド中のチオールに対しては求電子剤となる一方で, リシンなど他の求核性アミノ酸に対しては, この条件下では反応性を示さなかった。さらに, 翻訳系という希薄な条件が幸いしてか, ペプチド同士, もしくは系内に含まれる他のチオール成分であるシステインや DTT: dithiothreitol との分子間反応も確認されなかった。



Scheme 3 Cyclization reaction by cysteine-α-chloroacetamide group.

なお, この方法によって導かれる構造は, 生理活性天然物として単離される環状ペプチドによく見出される, ジスルフィド結合によるものと比較的類似している。このことに注目し, まず, 既存の大環状ペプチドへこの結合形成法を適用させることで擬天然物を得ることとした。こうして翻訳合成された human urotensin II のアナログ (図8) は, 天然物と同様に生理活性を有していたばかりでなく, もとの天然物にはない高い安定性を獲得していた^{19a)}。このことから, この環化法は生理活性を有する擬天然物の構築に有効な方法であることが示された。さらに, 4–14 アミノ酸から構成される 15–45 員環のいずれについても, この環形成反応は首尾よく進行し, 対応する環化ペプチドが得られることがわかった^{19b)}。これらのことから, この分子内結合形成法は高い安定性をもつ擬天然物のライブラリーの構築に用いられている。

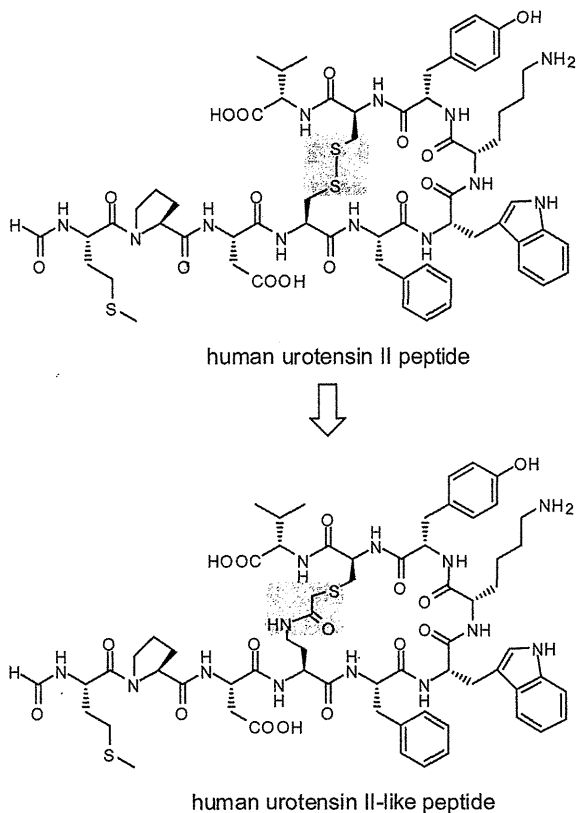


Fig. 8 Application of cyclization reaction for human urotensin II peptide.

3.2.2 Native chemical ligation による環構築法

いわゆる native chemical ligation とは、Wieland らによって報告されたチオエステル交換反応に続く $S \rightarrow N$ アシル転位反応²⁰⁾に基づき、Kent らによって考案されたアミド結合形成法である(図9)²¹⁾。すなわち、チオールの攻撃によってチオエステル交換反応が進行した後、そのチオエステルの近傍に位置したアミノ基によるアシル転位反応からアミド結合が導かれる。この一連の反応は穏やかな条件下進行し、アミド結合を形成させることから、翻訳系に組み込むには適していると考えられた。

しかし、はじめのチオエステルを準備することが難しい。非天然アミノ酸として直接導入するには安定性が低すぎるのである。この問題については、川上、相本らの報告²²⁾によって活路が開かれた。システイン、プロリン、そしてメチルエステルを連続して含む構造が自発的にチオエステルへと変換され、後はここを起点としてアミド結合が構築される、というのである。この方法であれば、我々の技術へ利用できると考えた(図10)。つまり、システイン、プロリンという2つの天然アミノ酸の他に、メチルエステルに対応するエステル構造が翻訳合成後のペプチド内に形成されるように、グリコール酸を非天然アミノ酸として導入しておけば、翻訳系においても同様のチオエステル構造が自発的に導かれるはずである。一方で、アシル転位反応を行うためのもう1つのシ

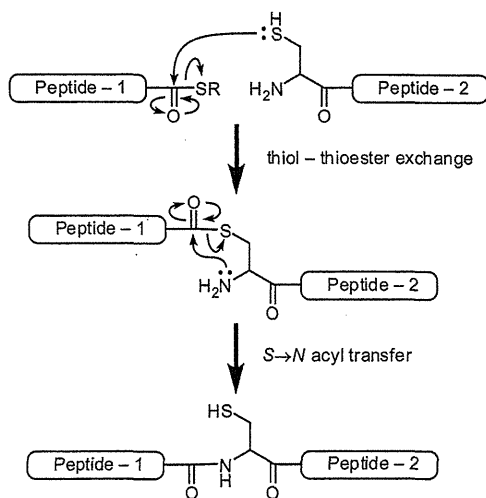


Fig. 9 Native chemical ligation.

ステインについては、環構築が進行するように適切なところへ配置しておく。いよいよ仕掛けは完成である。

これらの仕掛けを塩基配列に変換し、その核酸情報を翻訳系へ添加してみた。すると、狙いどおりに環状ペプチドが得られたのである。核酸情報としてプログラムされた native chemical ligation の命令がリボソーム内で解読され、我々の前に環状ペプチドとして表現された訳である。

本来であれば、翻訳システムではタンパク質性アミノ酸からなる直鎖ペプチドしか得られない。しかし、様々な知恵と工夫を結集させることで、ペプチドの主鎖構造がすべてアミド結合により連結された、安定な環状構造を持つ STFI-1²³⁾ (図11)をはじめ、様々な大環状ペプチドが生み出されたのである²⁴⁾。

3.3 擬天然物ライブラリーのスクリーニング

これまでに述べたりプログラミング技術や先述の2つの環化法を基盤として、様々な大きさの環構造を含むランダム配列のペプチドライブラリーが簡便に得られるようになった。この一連の擬天然物ライブラリーの構築法を我々は RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムと呼んでいる。最後に、少々有機合成化学から逸脱してしまうのだが、この RaPID システムにより構築された特殊ペプチドライブラリーからの探索戦略を2つ紹介したい。

3.3.1 活性評価型スクリーニング法 (RaPID スクリーニング法)

RaPID ライブラリーへの生理活性評価に基づき、生理活性ペプチドの塩基配列を獲得し、その配列に対応する擬天然物の構造情報を得る方法が、RaPID スクリーニング法である。この方法は、スクリーニングを繰り返すことによってライブラリーの多様性を減少させてゆき、生理活性ペプチドの塩基配列を対応づけ、同定す

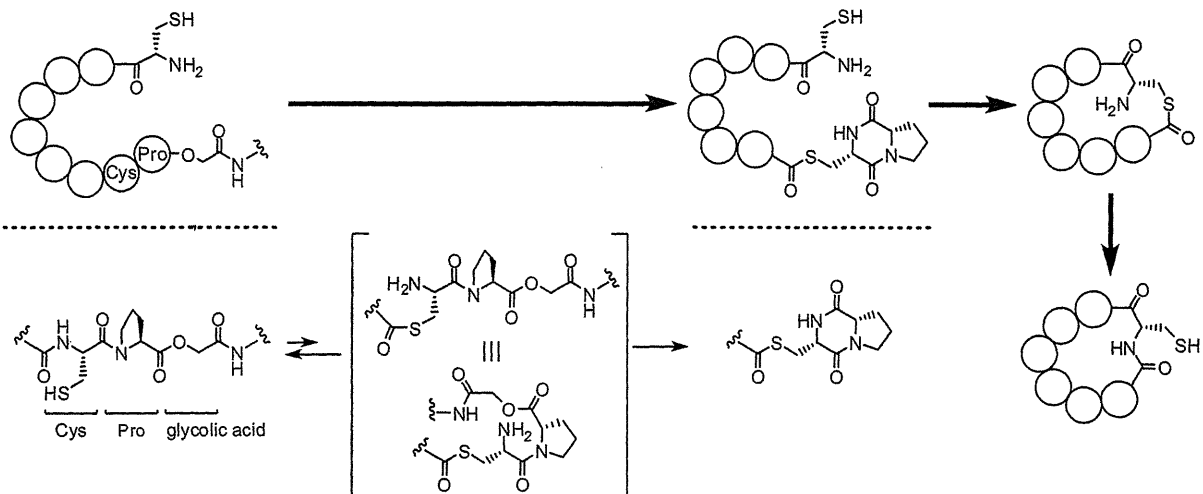


Fig. 10 Cyclization reaction via native chemical ligation.

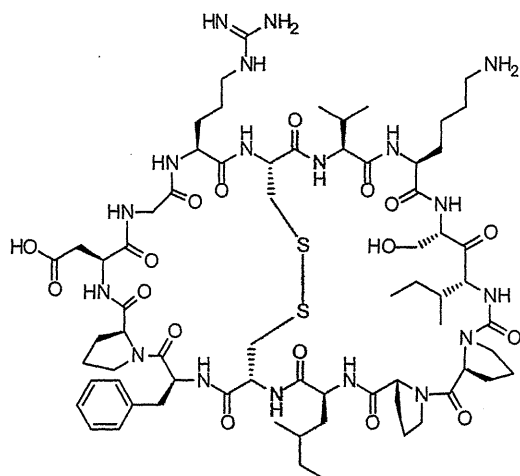


Fig. 11 SFTI-1.

る, というものである (図 12)²⁵⁾。

具体的には, まず, ライブラリーの DNA プールを構築する。これらの翻訳によって, ランダムなアミノ酸配列から構成される様々な大きさの大環状ペプチド構造が偏りなく得られるように, 核酸ライブラリーは設計されている。この DNA プールはプレート上の各ウェルへ分割された後, PCR により増幅される。一方で, 環形成の鍵となる非天然アミノ酸と, そのアミノ酸を割り当てたコドンに対応する tRNA から, フレキシザイムによって aa-tRNA を形成させ, wPURE システムを調製する。各ウェル内に含まれる様々な核酸情報に従って, この翻訳系による翻訳合成を行えば, それらのウェル内に様々な種類の RaPID ライブラリーを構築させることができる。このとき, それぞれのウェルには多種の特殊ペプチドとその塩基配列とが混在することになる。次に, これらに対して生理活性評価を行う。もし, ウェル内に活性が見出されれば, その中に含まれる特殊ペプチ

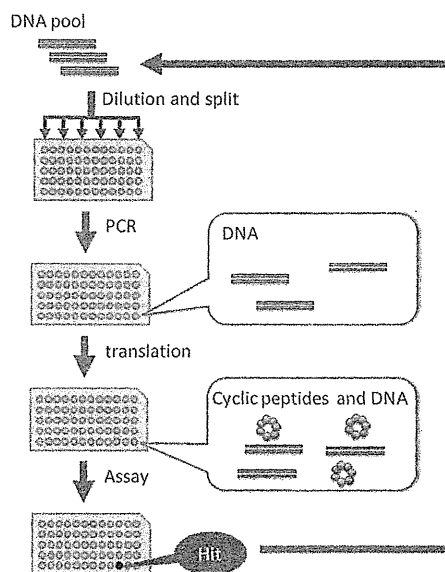


Fig. 12 RaPID screening cycle.

ドの何れかが活性を持つことになる。そこで, その中に含まれる DNA を再び分割する。この操作が繰り返されるにつれ, ライブラリーの多様性が減少していき, 目的とする生理活性分子の塩基配列が絞り込まれていく。こうして, 1つのウェル内に1種類の塩基配列が存在するのみとなれば, 生理活性分子とその塩基配列が対応づけられる。そこで, その核酸情報を読み取れば, 目的とする擬天然物のアミノ酸配列を知ることができるのである。

実際に, このスクリーニング法によって獲得された核酸情報に従って, あらためて環状ペプチドを合成したところ, その分子は期待どおりの生理活性を有していた。このことから, RaPID ライブラリーからの生理活性評価型スクリーニングの有効性が示されている²⁵⁾。

3.3.2 親和性評価型スクリーニング法 (RaPID ディスプレイ法)

RaPID システムによる擬天然物ライブラリー構築技術を、柳川、Szostak らにより開発された mRNA ディスプレイ法²⁶⁾へと応用させた方法が RaPID ディスプレイ法である。このライブラリーは、基本的には前述の場合と同様に、DNA プールと wPURE システムとから構築される。ただし、DNA から mRNA へと核酸情報を転写させた後、その mRNA に特徴的な修飾を行う一工夫がある。こうすることにより、この mRNA の核酸情報に基づいた特殊ペプチドの翻訳が完了したとき、mRNA とそのペプチドとの複合体が形成されるのである。RaPID ディスプレイとは、こうして得られる mRNA-特殊ペプチド複合体によって構成されるライブラリーから、高い親和性をもつ特殊ペプチドの塩基配列を獲得する技術である (図 13)。

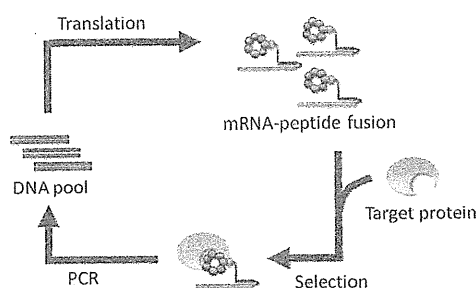


Fig. 13 RaPID display cycle.

このライブラリーでは、あらゆる特殊ペプチドが mRNA によって「タグ化」されているところがポイントであり、この点が(3.3.1)のライブラリーとは大きく異なる。すなわち、RaPID スクリーニング法では、そのライブラリーへのスクリーニングが繰り返されるにつれ、ライブラリーの多様性が減少してゆくことによって、独立して存在するペプチドとその塩基配列との対応づけが可能となった。RaPID スクリーニング法はこのような方法であることから、現実的に扱えるライブラリーの多様性に限界があったのである。一方で、RaPID ディスプレイ法の場合、それぞれのペプチドにはその構造情報を持つ mRNA がタグとして連結されている。従って、混合物の状態でのセレクションを行った後、タグの塩基配列を解析することにより容易に高親和性分子の同定が可能である。なお、分子生物学的手法として確立されている技術には、DNA への逆転写につづく PCR というプロセスを経て、mRNA の核酸情報を DNA の情報として増幅させる、というものがある。この方法を用いれば、セレクションにより得られた高親和性ペプチドの mRNA の情報のみが増幅された、新たな DNA プールを調製することが可能である。従って、この一連のサ

イクルを繰り返していけば、ライブラリー中の高親和性分子のみを増幅させることができる。それゆえに、はじめのライブラリー中に同一分子がたった1つしかない場合でも、そのセレクションが成立する。このことは、同一分子数の少ないライブラリーの設計が可能であることを意味し、多様性の大きなライブラリーであっても現実的な規模で構築できるという利点となる(実際には、理論上 10^{13} の多様性を持つライブラリーがエッペンドルフチューブの中で扱われている)。

この技術の基盤となっている mRNA ディスプレイの詳細については他の優れた総説¹⁸⁾を参照していただきたい。なお、この方法は多様性の大きなライブラリーへ利用可能であるものの、単純な親和性に基づいた評価法であることから、得られた擬天然物が必ずしも生理活性を持っているとは限らない。しかし、実際に RaPID ディスプレイ法を適用させて得られた高親和性分子の中には、生理活性を有する分子が見つかっており、この方法も RaPID システムに対する強力な探索戦略であることが示されている。

おわりに

本稿では、アミノアシル化リボザイムの発見を発端とし、タンパク質性アミノ酸に限定されることのない翻訳系の利用が可能になった経緯とともに、その応用について述べた。今後も、化学的視点と生物学的視点の両面から RaPID システムを展開していくことで、画期的な創薬リード化合物が得られるものと期待している。

(2009年9月24日受理)

文献

- 1) S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.*, 6, 1127 (1998)
- 2) 本稿ではタンパク質を構成している主な 20 種類のアミノ酸をタンパク質性アミノ酸とさせていただきます。天然には、20 種類のアミノ酸以外にもそれらのエナンチオマーや、メチル化、アセチル化などの修飾を受けたアミノ酸も広く存在する。そこで、これらを非タンパク質性アミノ酸とし、天然にみられるアミノ酸をタンパク質性と非タンパク質性アミノ酸とに区別することとした。一方で、天然にはみられないアミノ酸、もしくはアミノ酸に準ずる類似の構造について、非天然アミノ酸と呼ぶこととした。
- 3) (a) 翻訳機構を用いた、タンパク質性アミノ酸以外の導入方法として、4 塩基コドン法^{3b)}や、終止コドン法^{3c,3d)}などが知られている。これらの方法論では、天然の遺伝暗号に基づいた翻訳システムがそのまま保存されている。従って、そのシステムと人工的なアミノ酸導入方法との競合が避けられない。すなわち 4 塩基コドン法の場合、4 塩基単位のコドンに対応した遺伝情報が、3 塩基単位として翻訳されることが競合する。一方、アンバーコドン(UAG)を利用した終止コドン法の場合、翻訳終結因子である RF-1 が競合してしまう。その結果、目的とするポリペプチドの収率の低下を招くこととなる。(b) T. Hoshaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sishido, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9778 (1996); (c) C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science*, 244, 182 (1989); (d) J. D. Bain, C. G. Glabe, T. A. Dix, A. R. Cham-

- berin, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8013 (1989)
- 4) K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaugg, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell*, 31, 147 (1982)
 - 5) W. Gilbert, *Nature*, 319, 618 (1986)
 - 6) (a) 村上裕, 菅裕明, 蛋白質 核酸 酵素, 48, 1511 (2003); (b) M. Ohuchi, H. Murakami, H. Suga, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11, 537 (2007)
 - 7) H. Saito, D. Kourouklis, H. Suga, *EMBO J.*, 20, 1797 (2001)
 - 8) H. Murakami, H. Saito, H. Suga, *Chem. Biol.*, 10, 655 (2003)
 - 9) H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga, *Nat. Methods*, 3, 357 (2006)
 - 10) Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.*, 19, 751 (2001)
 - 11) (a) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 16861 (2008); (b) E. Nakajima, Y. Goto, Y. Sako, H. Murakami, H. Suga, *ChemBioChem*, 10, 1186 (2009); (c) Y. Yamagishi, H. Ashigai, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga, *ChemBioChem*, 10, 1469 (2009)
 - 12) T. J. Kang, S. Yuzawa, H. Suga, *Chem. Biol.*, 15, 1166 (2008)
 - 13) (a) B. D. Strahl, C. D. Allis, *Nature*, 403, 41 (2000); (b) T. Kouzarides, *Cell*, 128, 693 (2007)
 - 14) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004 (2001)
 - 15) Y. Sako, J. Morimoto, H. Murakami, H. Suga, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 7232 (2008)
 - 16) A. Ohta, H. Murakami, E. Higashimura, H. Suga, *Chem. Biol.*, 14, 1315 (2007)
 - 17) T. Kawakami, H. Murakami, H. Suga, *Chem. Biol.*, 15, 32 (2008)
 - 18) 土井信英, 柳川弘志, *生物物理* 41, 147 (2001)
 - 19) (a) Y. Sako, Y. Goto, H. Murakami, H. Suga, *ACS Chem. Biol.*, 3, 241 (2008); (b) Y. Goto, A. Ohta, Y. Sako, Y. Yamagishi, H. Murakami, H. Suga, *ACS Chem. Biol.*, 3, 120 (2008)
 - 20) T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.*, 583, 129 (1953)
 - 21) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, 266, 776 (1994)
 - 22) (a) T. Kawakami, S. Aimoto, *Chem. Lett.*, 36, 76 (2007); (b) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.*, 48, 1903 (2007)
 - 23) S. Lockett, R. S. Garcia, J. J. Barker, A. V. Konarev, P. R. Shewry, A. R. Clarke, R. L. Brady, *J. Mol. Biol.*, 290, 525 (1999)
 - 24) T. Kawakami, A. Ohta, M. Ohuchi, H. Ashigai, H. Murakami, H. Suga, *Nat. Chem. Biol.*, 5, 888 (2009)
 - 25) (a) H. Nakano, K. Kobayashi, S. Ohuchi, S. Sekiguchi, T. Yamane, *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 456 (2000); (b) Y. Koga, K. Kobayashi, J. Yang, H. Nakano, T. Yamane, *J. Biosci. Bioeng.*, 94, 84 (2002); (c) S. Rungpragayphan, Y. Kawarasaki, T. Imaeda, K. Kohda, H. Nakano, T. Yamane, *J. Mol. Biol.*, 318, 395 (2002)
 - 26) (a) R. W. Robert, J. W. Szostak, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94, 12297 (1997); (b) N. Nemoto, E. Miyamoto-Sato, Y. Hushimi, H. Yanagawa, *FEBS Lett.* 414, 405 (1997) (c) W. W. Ja, A. P. Jr, West, S. L. Delker, P. J. Bjorkman, S. Benzer, R. W. Robert, *Nat. Chem. Biol.*, 3, 415 (2007)

PROFILE



樋口 岳 東京大学先端科学技術研究センター・博士研究員
 [経歴] 2001年東京工業大学生命理工学科卒業。2001-05年中外製薬株式会社研究員。2008年東京工業大学理工学研究科修了、理学博士。2008年より現職。[専門]有機合成化学。[連絡先] e-mail: higuchi@cbl.rcast.u-tokyo.co.jp



菅 裕明 東京大学先端科学技術研究センター・教授
 [経歴] 1989年岡山大学工学部精密応用化学科卒業。1994年米国マサチューセッツ工科大学化学科卒業, Ph.D. 1994年米国マサチューセッツ総合病院, ハーバード大学医学部, 博士研究員。1997年米国ニューヨーク州立バッファロー大学化学科助教授。2002年同准教授(テニュア)。2003年東京大学先端科学技術研究センター助教授。2005年より現職。[専門]ケミカルバイオロジー, バイオテクノロジー。[連絡先] e-mail: hsuga@rcast.u-tokyo.ac.jp

RaPID システムが拓く新創薬戦略



東京大学大学院理学系研究科化学専攻
助教

後藤 佑樹

ごとう ゆうき

2003年 京都大学工学部工業化学科卒業
2005年 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 修士課程修了
2008年 東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻 博士課程修了 博士(工学)
2008年 イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 Postdoctoral research associate (日本学術振興会 海外特別研究員)
2009年 東京大学先端科学技術研究センター 助教
2010年 東京大学理学系研究科化学専攻 助教



東京大学先端科学技術研究センター
特任研究員

伊東 利紗

いとう りさ

2006年 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科卒業
2008年 東京農業大学農芸化学部栄養生化学研究室 修士課程修了
2008年 株式会社ハイテック研究開発部門 技術職員
2009年 東京大学先端科学技術研究センター 特任研究員



東京大学大学院理学系研究科化学専攻
教授

菅 裕明

すが ひろあき

1986年 岡山大学工学部工業化学科卒業
1989年 岡山大学工学部精密応用化学科 修士課程修了
1994年 米国マサチューセッツ工科大学化学科修了 Ph.D.
1994年 米国マサチューセッツ総合病院 ハーバード大学医学部 博士研究員
1997年 米国ニューヨーク州立バッファロー大学化学科 助教授
2002年 米国ニューヨーク州立バッファロー大学化学科 テニユア准教授
2003年 東京大学先端科学技術研究センター 准教授
2005年 東京大学先端科学技術研究センター 教授
2010年 東京大学理学系研究科化学専攻 教授

1. はじめに

近年、世界の製薬業界では欧米資本のメガ・ファーマが台頭しており、その企業規模の大きさに任せ膨大な費用・期間をかけたR&Dや、M&Aにより有望な薬剤候補を囲い込み将来の新薬を確保するなどのアプローチが、一般的に行われている。メガ・ファーマが存在感を示すこの様な競争環境の中で、(世界的に見れば)中小規模の日本の製薬企業が生き残り、新規薬剤の開発という形で社会に貢献していくためには、いかにメガ・ファーマとは違ったアプローチで、かつ効率良く新薬開発を進められるかという点が、重要な要素となることは間違いないであろう。これを可能にする日本オリジナル

の技術の開発や研究体制の整備には、産・官・学の連携が不可欠ではあるものの、独創的かつ革新的な技術の発明は挑戦的なプロジェクトにならざるを得ず、この部分は特に「学」のパートが中心となって担わなければならない。

本稿では、将来、新機軸の創薬アプローチとなり得る可能性を秘めた「日本発・大学発」の技術として、RaPIDシステムを用いた生理活性特殊ペプチドの探索手法を紹介する。この手法により、医薬品に要求される特性を併せ持つ擬天然物ペプチドの迅速な開発が期待される。

2. 医薬品候補としての特殊ペプチド

19世紀以降、医薬品開発の中心は有機合成化学に支

えられた有機小分子薬剤であった(図1)。長年の経験によって小分子のメデイシナルケミストリーの技術・知見が確立していること、開発コストが比較的安価であることや、低分子であるため細胞膜を透過でき経口投与も可能、また免疫原性も持たないことなどが、その理由と言えよう。しかしながら、化合物ライブラリーからリード化合物の探索を行った後、構造活性相関解析を重ね、目的の活性や選択性を持つ化合物を得るという従来の開発手法は多くの問題点を抱えている。その一例としては、化合物ライブラリーの多様性を大きくするのが難しい(～10⁷)、スクリーニングや構造活性相関に多くの時間を費やす、標的との結合表面積が小さいため特異性を得るのが困難(つまり副作用が出やすい)、などがあげられる。コンビナトリアルケミストリーを用いた大規模ライブラリーの構築や、標的タンパク質の結晶構造を基にリード化合物を論理的に設計するアプローチも近年では行われているが、いずれも限界や問題点を抱えている。

	小分子医薬	特殊ペプチド医薬 (4-14 aa) 500-1,500 Da	ペプチド医薬 (6-50 aa) 700-8,000 Da	抗体医薬 50,000-150,000 Da
分子量	50-1,000 Da	(4-14 aa) 500-1,500 Da	(6-50 aa) 700-8,000 Da	50,000-150,000 Da
膜透過性	○	△	×	×
生体内安定性	○	○	×	×
特異性	△	○	△	○
ライブラリー構築	△	× → RaPID system → ○	○	○

図1 特殊ペプチド医薬とその他の医薬品との比較

一方で近年では、ホルモンなどのペプチドや、抗体などのタンパク質を薬剤として利用するバイオ医薬品が増えてきている。これらバイオ医薬品は一般的に標的タンパク質に高い特異性で作用し、副作用を抑えつつ強力な薬効を示すことができ、また、遺伝子工学を用いることで大規模なライブラリーから目的分子の探索を行えるという長所を持つ。しかしながら、高コスト、免疫原性を持ちやすい、細胞膜を透過できないなどといった、乗り越えなければならない課題を多く含んでいる。

小分子医薬とバイオ医薬の中間的な性質を持つアプローチとして、特殊ペプチド医薬がある。ここでいう特殊ペプチドとは、タンパク質合成に使われる20種類のアミノ酸をはじめとする「ありふれた」L体のαアミノ酸だけで構成されておらず、D体アミノ酸・N-メチルアミノ酸・N末端脂肪鎖修飾・大環状骨格などといった「特殊」骨格を含むペプチド一般を指す¹⁾(図2)。上に

例をあげた特殊骨格は、ペプチダーゼなどに対する生体内安定性の向上・膜透過性の上昇に寄与し、通常のペプチド医薬の欠点を補うことができるため、特殊ペプチドは医薬品として高いポテンシャルを持つと期待される。しかし、これまでに実用化された特殊ペプチド医薬品は、ほぼ全て天然物由来のものであり、十分な構造・配列多様性を持ったライブラリーからの新規化合物の探索は実質上不可能であった。

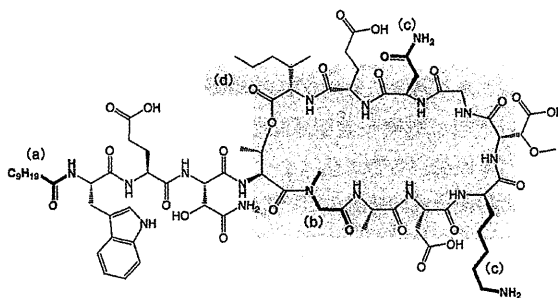


図2 特殊ペプチドの一例(A54145A1)
(a) N末端アシル基、(b) N-メチルアミノ酸、(c) D-アミノ酸、(d) 大環状骨格、等を分子内に含む

我々はこの問題を解決する手法として、RaPID(Random Peptide Integrated Discovery)システムを開発した。RaPIDシステムではタンパク質合成系である翻訳反応と進化分子工学的手法を活用し、特殊ペプチドの大規模ライブラリーの構築と、そこからの生理活性ペプチドの探索とを同時並行で行うことで、迅速な新規生理活性特殊ペプチドの探索を可能にする技術である。

3. 翻訳合成による 化合物ライブラリーの構築

RaPIDシステムでは翻訳反応を利用して特殊ペプチドライブラリーを合成する。ここではまず、翻訳合成をライブラリー構築に利用するメリットについて説明したい。翻訳とは全ての生体内で普遍的に行われているタンパク質の生合成反応であり、U・C・A・Gの塩基の並び(遺伝情報)からなるmRNAを鋳型としてリボソームがアミノ酸を順に繋ぎ合わせる、ポリペプチドの精密重合系である。強調すべき点として、mRNA上の遺伝情報は3つの塩基を1セットとしたコドンとして読みとられ、それぞれのコドンは「普遍遺伝暗号」に指定されるとおり20種類のアミノ酸のいずれか(もしくは翻訳停止信号)に厳密に対応する(図3)。つまり、合成し

mRNA
 ...AUG-GCU-UUG-ACC-GAG-CAC-GGA-ACC-GGG-CCA-UGU-UUC-UAA...

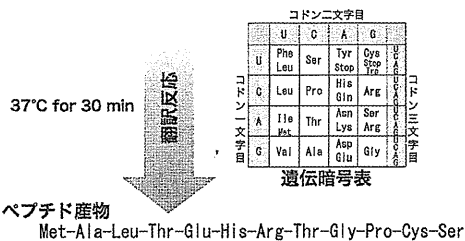


図3 翻訳反応における鋳型依存的ペプチド合成

たいペプチドやタンパク質の構造情報を持つ mRNA 配列を用意し、無細胞翻訳反応溶液に加えれば、30分程度で望みの翻訳産物が正確かつ簡便に合成される。

この翻訳合成の鋳型依存性を活用すれば、大きな多様性を持つペプチドライブラリーを迅速に構築可能だ。ランダム配列を持つ mRNA ライブラリーをまとめて翻訳反応系に加えれば、それぞれに対応するペプチドのライブラリーが一挙に構築される。この場合、100 μ L のスケールで翻訳反応を行うだけで、 10^{13} をゆうに越える多様性を持つライブラリーが合成される計算になる。そのうえ、mRNA は逆転写反応とそれに続く PCR により増幅ができ、クローニング・シーケンシングによる塩基配列の決定が可能であるため、化合物の再合成やデコンボリューションも容易であるという長所も併せ持つ。さらには後述するように、進化分子工学的手法による活性ペプチドのスクリーニングを同時に行えるというメリットもある。

このように効率のかつ高機能化されたペプチドライブラリーの構築を達成できる翻訳系ではあるが、一方で 20 種類の天然アミノ酸からなるペプチドしか合成できないという致命的な欠点を持つ。つまり翻訳系では、D-アミノ酸や大環状骨格などを有する特殊ペプチドを通常合成できない。実際、天然物として単離される特殊ペプチドは、翻訳後に酵素による複雑な修飾反応か、非リボソームペプチド合成酵素という巨大酵素群による多段階生合成のどちらかの経路で合成されており、単純な翻訳合成により産生される例はない。

この翻訳反応における生成物の構造的制限を解決するために、我々は人工 RNA 触媒「フレキシザイム」を用いた遺伝暗号のリプログラミング法と、翻訳後に選択的に進行する有機化学反応とを組み合わせることで、多様な特殊骨格の翻訳導入を可能にした。

4. 遺伝暗号のリプログラミング

上述のようにリボソームは mRNA を鋳型とし、その塩基配列をアミノ酸の配列へと遺伝暗号に基づいて変換することで配列制御を伴ったポリペプチド合成を行う。では、この遺伝暗号はどのように分子レベルで規定されるのだろうか？このコドン-アミノ酸の対応関係には、①正しいアミノ酸と tRNA のペアリング、② tRNA-mRNA 間の相補的塩基対形成、の 2 つが重要になる。

天然の翻訳系では、アミノ酸はアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) の働きで tRNA に結合される (アミノアシル化)。このとき、たとえばトリプトファンは、CCA という配列 (アンチコドン) を持ったトリプトファン専用の tRNA へ結合される、といったようにアミノ酸-tRNA の正確なペアが築かれる。そのうえで、mRNA 上のコドン (トリプトファンの場合 UGG) がアミノアシル tRNA のアンチコドン部分と正確に塩基対形成することで、塩基配列がアミノ酸配列へと変換されていく。

翻訳反応溶液中に存在するアミノ酸・ARS などの構成を変更し、さらに、意図的にペアリングを変更したアミノアシル tRNA を加えるなどの操作を行うことで遺伝暗号を「書き換え」、翻訳反応に利用されるアミノ酸ビルディングブロックの種類を操作するという概念が遺伝暗号のリプログラミングである²⁾。たとえば、翻訳反応溶液系を調製する際、いくつかのアミノ酸を加えない (つまり、いくつかのアミノ酸を天然の系から取り除く) としよう。この場合、どのアミノ酸も指定することができない「空の」コドンが存在するため、正しく翻訳系は機能しない (図 4 左)。ここに、利用したい特殊アミノ酸と結合し、かつ空コドンに対応したアンチコドンを持つ tRNA を加えれば、元々は天然のアミノ酸を指定していたコドンを書き換え、意図した特殊アミノ酸を指定するように変更できる (図 4 右)。これにより、20 種類のタンパク質性アミノ酸だけでなく、特殊アミノ酸を利用する人工翻訳系を構築できる。

従来、遺伝暗号のリプログラミングに必要な特殊アミノアシル tRNA は、煩雑な化学合成法³⁾か、アミノ酸の構造に制限の多い酵素法⁴⁾で作るほかなかったが、我々が開発したアミノアシル化反応を触媒する人工 RNA 触媒「フレキシザイム」により、その合成における障害が解消された^{5),6)}。この技術では、適度に活性化されたア

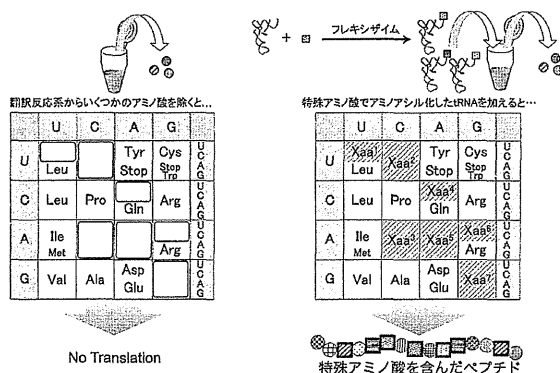


図4 遺伝暗号のリプログラミング

ミノ酸とtRNAとを混合し、フレキシザイム存在下、水溶液中・0℃で数時間反応させることで、幅広い構造を持った特殊アミノアシルtRNAを簡単に合成できる。フレキシザイムにより、さまざまな特殊アミノアシルtRNAの簡便な調製が実現したことで、遺伝暗号のリプログラミングの応用性・実用性は大きく広がった。

実際に我々は、これまでに本技術を利用して、N末端アシル基⁷⁾・D-アミノ酸⁸⁾・エステル骨格⁹⁾・N-メチルアミノ酸¹⁰⁾・ペプチド骨格¹¹⁾など、多彩な特殊構造を含むペプチドの翻訳合成に成功している。

5. 翻訳後有機反応による特殊ペプチドの翻訳合成

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法により、さまざまな特殊アミノ酸を利用した翻訳合成を実行可能になったが、これだけで合成可能となる特殊骨格には限界がある。たとえば、大環状骨格などに代表されるマクロな特殊骨格は、単純にアミノ酸を残基単位で置き換えただけでは形成できない。そこで我々は、翻訳後に自動的に有機化学反応を引き起こす（もしくは穏和な条件下で引き起こす）官能基を有する特殊アミノ酸を利用し、翻訳合成可能な特殊ペプチドの構造的バリエーションを拡げることによって成功してきた。

ここでは、チオエーテル結合で閉環した大環状ペプチドの翻訳合成を例にとって、この戦略について説明する（図5）。このケースでは、翻訳開始反応における遺伝暗号をリプログラミングし、アミノ基がクロロアセチル基で修飾された特殊アミノ酸（たとえば、N-クロロアセチル-D-フェニルアラニン (ClAc-DPhe) など）をN

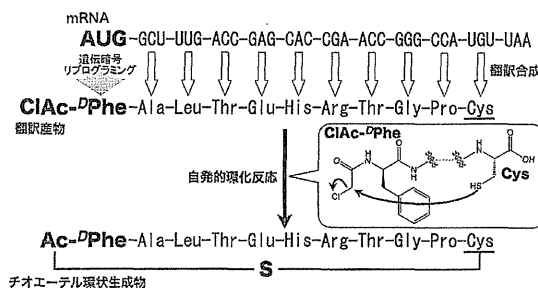


図5 自発的翻訳後求核反応によるチオエーテル環状ペプチドの翻訳合成

末端に持つペプチドを翻訳合成する。また、ペプチド鎖中にシステイン (Cys) が現れるように設計したmRNAを翻訳の鋳型として使う。この翻訳反応の結果生成するペプチドはもちろん直鎖状であるが、システインのチオールとN末端クロロアセチル基の間で分子内求核置換反応が起こることで、チオエーテル結合で閉環した大環状骨格が構築される⁷⁾。特筆すべきは、この翻訳後有機反応が、翻訳反応液中で自発的かつ選択的に起こる点である。つまり、環化反応には特別な試薬を必要とせず、翻訳反応とカップルして1つのチューブ中で完了するため、まるで翻訳反応産物であるかのように大環状ペプチドが得られる。さらに重要なことに、ここで得られるチオエーテル型の環状ペプチドは、天然の翻訳産物において形成されるジスルフィド結合による環状構造とは対照的に、細胞内や血清中などの還元条件下において安定であり、種々のペプチダーゼによる分解に対して耐性を示す¹²⁾。

この他にも、翻訳後に進行する有機反応を利用することで、翻訳合成が可能となる特殊骨格は多い。これまでに我々は、脱水アミノ酸¹³⁾・ランチオニン骨格¹³⁾・C末端アミド結合¹⁴⁾・C末端ラクトン/ラクタム構造¹⁴⁾・主鎖閉環骨格¹⁵⁾・二環式骨格¹⁶⁾・蛍光性環状構造¹⁷⁾などの翻訳導入にも成功している。

6. RaPIDシステムによる機能性特殊ペプチドの人工進化

ここまで、翻訳反応を利用すれば10¹³以上もの多様性を持つライブラリーが迅速に構築可能であること、また翻訳反応で特殊ペプチドの合成を可能にする技術について述べてきた。つまり、これらの手法を組み合わせれば、膨大な多様性を誇る特殊ペプチドライブラリーを構築で

きることになる。では、そのなかから望みの機能を持つペプチドを効率良く探索するには、どうすればよいだろうか？ RaPID システムでは、特殊ペプチドの翻訳合成技術を柳川・Szostak らが報告した mRNA ディスプレイ法^{18), 19)} と組み合わせることが可能である。我々は、RaPID システムに適するよう mRNA ディスプレイ法に改良を施し、その結果、非常にクオリティの高い特殊ペプチドライブラリーをディスプレイできる手法を開発した。この技術は、目的のタンパク質に結合する特殊ペプチドを「人工進化」させることができ、迅速にペプチドライブラリーから目的の結合性ペプチドを単離することを可能にした。

以下、RaPID システムで行う人工進化の流れを、特定の標的タンパク質に結合する環状ペプチドの探索を例にとって説明する (図6)。まず、AUG (開始コドン) と UGU (システイン) に挟まれた領域にランダム配列を持つ mRNA ライブラリーを用意し、その 3' 末端部位にピューロマイシンを付加する。ClAc-^DPhe で開始反応をリプログラミングした系でこの mRNA 誘導体を翻訳すると、上で述べた通りチオエーテル環状ペプチドのライブラリーが合成されるが、さらにこの場合はピューロマイシンの働きにより、翻訳産物のペプチドとその鋳型である mRNA とが共有結合で連結される。つまり、得られたライブラリー構成分子の1つひとつには、それ

ぞれの配列情報を記録し、また増幅・読み取り可能な「タグ」が付く。この環状ペプチドライブラリーと、固相担体に固定化した標的タンパク質と混合し、標的に結合し得る分子だけを回収する (セレクション)。回収されたペプチド上の DNA タグを PCR で増幅後、転写反応により mRNA ライブラリーへと再変換する。ここで注目したいのは、ここで回収された mRNA ライブラリーは「分子の人工進化」を経ており、より標的タンパク質に結合しやすいペプチドをコードした配列の集団になっている点である。この一連の進化サイクルを数回繰り返すことで、合成される特殊ペプチドライブラリーは、標的タンパク質に強く結合する偏った配列の集団へと収束していく。その後、DNA タグをクローニング・シーケンシングし、mRNA の配列 (つまり目的の環状ペプチドの構造と等価) を同定する。翻訳の「鋳型依存性」を最大限に活用した本手法では、 10^{13} の多様性のライブラリーからの特殊ペプチド薬剤候補の探索を、2週間以内に完了することができる。

7. RaPID システムによるサイクロフィリンD 結合分子の開発

ここでは、RaPID システムによる新規機能性特殊ペプチドの探索の実例として、サイクロフィリンD (CypD) 結合分子の開発を紹介したい。

サイクロフィリンはプロリルイソメラーゼ活性を有し、細胞の増殖や運動性などさまざまな細胞機能に関わっている。強い免疫抑制活性を持つ天然由来の特殊ペプチド、サイクロスポリンAの標的として知られていることから分かる通り、このタンパク質ファミリーは種々の疾病に対する薬剤のターゲットとしても注目されている。しかしながら、サイクロフィリンファミリーには20種類ものアイソフォームが存在し、またそれぞれの活性中心が強く保存されていることから、アイソフォーム選択的な阻害は難しい場合が多い。ファミリーのなかでも、ミトコンドリアに局在する CypD はミトコンドリアの permeability transition pore (PTP) 形成に関わり細胞死を引き起こし、またアミロイドβに結合することで神経細胞死も誘導する。実際最近の研究により、CypD 阻害剤は筋ジストロフィーやアルツハイマー病の治療薬として有望であることがわかってきた。我々は、アイソフォーム選択的阻害剤の開発を見据え、

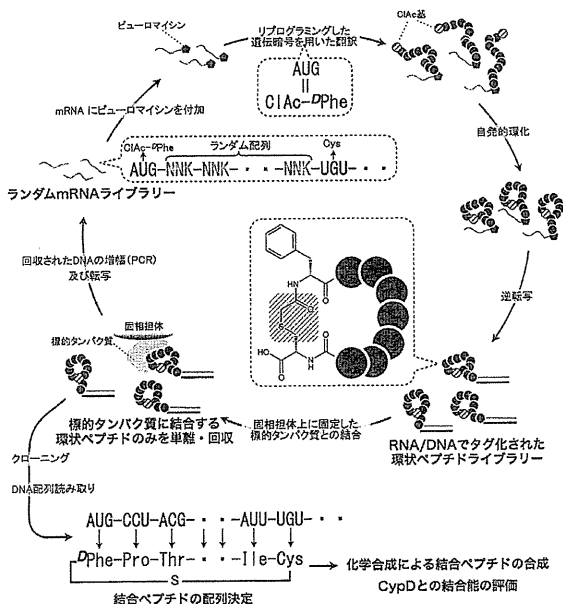


図6 RaPID システムによる疾病関連タンパク質結合特殊ペプチドの探索