

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14335

研究課題名（和文）生成物解離を制御したRNA-ペプチド複合体リセプター酵素の創製

研究課題名（英文）Construction of a ribonucleopeptide receptor-based synthetic enzyme with high turnover number by controlling the affinity for the product

研究代表者

仲野 瞬 (Nakano, Shun)

京都大学・エネルギー理工学研究所・助教

研究者番号：40650809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではRNA-ペプチド複合体（RNP）を構造基盤に用いたリセプター作製法を応用して、高い回転数を有する人工リセプター酵素の作製を目指した。高い基質選択性を有するRNPリセプターの作製条件の検討を行い、ATPに高選択的なりセプター、蛍光センサーの作製に成功した。一方、ペプチドライブラリーの作製条件について検討したが、収率よく目的のライブラリーを合成するために最適な条件を確立することはできなかった。このほか、N末端にCys残基を導入してそのチオール基に収率よく蛍光分子を化学修飾するための条件を確立したほか、共有結合化RNPを効率よく作成するための反応条件を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リセプターに触媒分子を修飾する設計によって、触媒活性や反応回転数をどの程度向上できるのかについては、十分な検証がなされていない。リセプターの改変による人工酵素作製の試みでは、「生成物の解離」をどのように実現するかが大きな課題となる。触媒分子修飾リセプターの反応回転数の向上を行うために、「生成物の解離」を考慮したセレクションをおこない、触媒活性の向上が達成できるのかについて検討するために必要となる技術開発を行った。この成果は今後、高い触媒活性を有する酵素を目的に応じた様々な用途に合わせて任意に作製するための基礎的な技術を確立するために有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：RNA-peptide complex has been used to construct a receptor that was used to develop the receptor-based fluorescent sensor and catalyst. In this study, I tried to develop a construction method of the receptor-based artificial enzyme with high turnover number by controlling the affinity for the substrate and product. The highly selective ATP receptor could be constructed by applying in vitro selection using RNP scaffold. However, the method for construction of the peptide library that can be used to SELEX could not be established. As the other related results, the reaction conditions was successfully optimized for the modification of cysteine-introduced Rev peptide and the formation of covalent linkage between RNA and peptide subunit of RNP scaffold.

研究分野：生物有機化学

キーワード：リセプター RNA-ペプチド複合体 in vitroセレクション ライブラリー mRNAディスプレイ 蛍光センサー 人工酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

標的基質に特異的に結合するリセプターに触媒分子を修飾し、基質と触媒基の近接効果によって反応を加速させる「触媒活性をもつリセプター」は、古くから人工酵素のモデルとして開発されてきた。しかし、シクロデキストリンなどの合成分子をリセプター分子として用いる場合には、天然酵素のような高い基質選択性は期待できない。

また、触媒基の最適な立体配置を検討するために詳細な構造情報が必要であり、触媒分子の修飾箇所を決定するための労力も大きい。触媒活性、反応回転数、反応選択性を改善し、真の「人工酵素」を作製するためには、分子設計や作製方法に大きな改善が必要である。

我々はこれまでに RNA-ペプチド複合体 (RNP) リセプターを利用して、「触媒分子を修飾したリセプター」のライブラリーを簡便に構築する方法を開発してきた (*Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1881)。三次元構造が明らかになっている RNP を基本骨格に用いて、RNA サブユニットに様々な塩基配列を導入した「RNP ライブラリー」の中から、*in vitro* セレクションにより標的基質に特異的に結合する「RNP リセプター」を作製できる。ライブラリー法の適用により、構造情報の有無にかかわらず高い基質選択性をもつリセプターを獲得することができる。また、構造多様性をもつ基質結合性 RNA サブユニットと、多様な配列をもつペプチドリンカーを介して触媒分子を修飾したペプチドサブユニットとの複合体形成により、簡便に多様な構造をもつ触媒分子修飾リセプターライブラリーを作製できる。エステル加水分解反応を標的として触媒活性を指標としたスクリーニングを行った結果、反応を加速する RNP リセプターを作製に成功した。しかし、その加速効果は 1.2 倍と低かった。

2. 研究の目的

リセプターに触媒分子を修飾して、基質と触媒基を近接させることにより標的反応を加速するリセプターがこれまでに作製されてきたが、天然酵素の触媒活性には遠く及ばない。これらが真の「人工酵素」へと発展するためには、触媒の反応速度、代謝回転数、反応選択性を大きく改善するための、天然酵素の触媒反応機構に基づいた作製法が必要である。

本研究では、RNA-ペプチド複合体 (RNP) リセプターに触媒分子を修飾した「触媒活性を有するリセプター」の創製法を拡張して、触媒分子修飾 RNP リセプターのペプチドライブラリーの多様性を拡大する方法と、生成物の解離を促進し触媒反応の回転数を高めた RNP リセプターを選択する方法を開発する。これにより、高い基質選択性と高い触媒活性をもつ「人工酵素」を効率よく獲得する方法を確立する。

3. 研究の方法

三次元構造が明らかな、Rev ペプチド-RRE RNA 複合体を基本骨格として用いる。mRNA ディスプレイ法を用いてペプチドライブラリーを作製する。N 末端を Cys 残基とし、Rev ペプチドとの間の領域を「構造多様性をもつペプチドリンカー領域」としてランダム化する。Native chemical ligation (NCL)法 (*Science*, 1994, 266, 776)を用いて、N 末端の Cys 残基に対してチオエステル化した合成触媒分子 DMAP (DMAP-SR) を特異的に修飾する。NCL 後に提示される Cys 残基のチオール基に、標的反応に用いるもう一方の基質の修飾を行う。チオエステル基質をクロロアセチル (CA) 基を有するリンカーを介して、Cys 残基のチオール基へ修飾する。縮合条件は申請者がこれまでに蛍光性 RNP センサーライブラリーの作製 (*ChemBioChem* **2017**, *18*, 2212) に利用した条件を参考にする。また、このリンカーに光開裂基を導入し、セレクション後に光開裂によって基質がライブラリーから分離されるよう設計する。

CoA 結合性の RNA アプタマーを用いて、これまでに申請者が開発したモジュラー型 RNP リセプター設計法 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, *21*, 4503) を適用し、CoA 結合性 RNP リセプターを作製する。1. により作製された触媒分子修飾ペプチドライブラリーと複合体形成させ、「高い構造多様性をもつ触媒分子修飾 CoA 結合性 RNP リセプターライブラリー」を構築する。CoA を固定化した樹脂と、前述の RNP ライブラリーを用いてセレクションを行う。CoA とペプチドサブユニットに修飾した活性化チオエステル基質および触媒分子が近接し、CoA チオエステルが生成すると、RNP のペプチドサブユニットが樹脂と共有結合的に連結される。バッファーによる洗浄と CoA による競合的な洗浄により、化学反応が進行しなかった RNP を除去する。残存した RNP を基質固定化リンカー中の光開裂基を分解して回収する。この際、樹脂上には生成物が提示され、生成物に対して高い親和性をもつ RNP は非共有結合的に再結合する。非結合画分を回収することで、生成物に対する親和性が低い RNP を回収する。選択・増幅を繰り返し、mRNA-DNA 量を指標として、セレクションの収束を確認する。DNA 配列解析により、選択した RNP のペプチドサブユニットの配列を解析する。同定した配列のペプチドを合成・単離し、触媒活性を評価する。速度論解析に基づいて従来のリセプターを基にした酵素と比較する。さらに、生成物の解離に対する選択圧の適用の有無によって触媒活性に差異が認められるかを検証する。

4. 研究成果

(1) リセプター酵素の基質選択性に直結する、RNP リセプターの基質選択性をコントロールするための分子選択条件の検討をおこない、その成果をもとに「高選択的に ATP および ADP を識別する蛍光 RNP センサーの作製と同時検出」について研究を拡張し論文発表を行った (Chem. Comm. 2019, 55, 1611-1614.)。ネガティブセレクションを行う基質として ADP を用いて *in vitro* セレクションを行った。4 度、または 25 度下での分子選択の結果、これまでに報告されていない塩基配列を有する、ATP 結合性の RNA アプタマーを獲得することができた。うち 1 つのクローン (sAn02) は ATP、ADP 間で異なる親和性を示し、ATP に対する選択性を有することが示されたが、その基質親和性は平衡解離定数が 1 mM 以上と低かった。さらに、このセレクションの中途のラウンドのライブラリーを開始ライブラリーとして、基質低濃度条件下での分子選択や、尿素を用いた変性による溶出によって、基質親和性が向上したクローンや別種の ATP 高選択性アプタマーの獲得を目指したが、これらの条件を課す前とほぼ同じ塩基配列を有する RNA アプタマーへと収束した。初期の数ラウンドでの ADP によるネガティブ選択によって、得られる分子種がかなり絞られた状態になっていることが予測される。AMP やあるいは低濃度の ADP を用いた分子選択から開始し、徐々に強い競合条件を課していくことで、高基質選択性を有しかつ基質親和性の高い RNA が獲得できる可能性がある。

(2) RNP 触媒設計に使用する CoA 結合性アプタマーの分子設計を、これまでに我々が開発したモジュラー型 RNP リセプター設計法を利用して検討した。続いて、触媒分子修飾ペプチドサブユニットの合成条件の確立および機能化に関して、セレクションに最適なライブラリーデザインの検討と、ペプチドサブユニットの合成および精製条件を検討した。特に Rev ペプチドの N 末端にシステイン残基を導入した Cys-Rev のチオール基に対して、効率よく化学修飾を行う条件についてマレイミド基を有する蛍光分子を用いて検討し、最適な反応条件を確立した。この反応を用いて、セレクションに使用するペプチドライブラリーに対して特定の基質や光開裂基を有するリンカーの化学修飾が可能になると考えられる。mRNA ディスプレイを応用したペプチドライブラリーの合成条件については、効率的な翻訳反応を行う条件検討を十分に行うことができず、収率よく目的の共有結合化 RNA-ペプチドライブラリーを合成する条件の確立には至らなかった。

(3) 共有結合化 RNP 合成の条件最適化を図るために、様々な pH 条件や Rev ペプチドの配列の反応効率に関する寄与などを検証し、論文発表を行った。過ヨウ素酸ナトリウムを利用した RNA1 の 3' 末端の酸化によるジアルデヒド形成ののち、ヒドラジド基を有するペプチド隣家を修飾した Rev ペプチドとの反応により、RNP を共有結合化した。pH4~7 の条件下で 37 度下、3 時間の反応により、90% 以上の高い反応収率で生成物が得られることが示された。配列をスクランブル化し、Rev ペプチドとの特異的な複合体形成に必要な RRE 配列をなくした RNA や Rev ペプチド配列を削除したリンカー部分のみのペプチドとの反応収率評価によって、この反応は RNA-ペプチド間の静電的相互作用が効率化に大きく寄与していることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Shun, Shimizu Musashi, Dinh Huyen, Morii Takashi	4. 巻 55
2. 論文標題 Highly selective dual sensing of ATP and ADP using fluorescent ribonucleopeptide sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C8CC09934K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shun, Konishi Hiroaki, Morii Takashi	4. 巻 641
2. 論文標題 Receptor-based fluorescent sensors constructed from ribonucleopeptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Enzymol.	6. 最初と最後の頁 183 ~ 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.mie.2020.04.041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Shun, Seko Taiki, Zhang Zhengxiao, Morii Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 RNA-Peptide Conjugation through an Efficient Covalent Bond Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 8920 ~ 8920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app10248920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Shun Nakano, Musashi Shimizu, Huyen Dinh, Takashi Morii
2. 発表標題 Highly selective detection of ATP and ADP by using fluorescent ribonucleopeptide sensors
3. 学会等名 CISNAC2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun Nakano, Takashi Morii
2. 発表標題 Selective detection of ATP and ADP by using fluorescent ribonucleopeptide sensors
3. 学会等名 The 2nd International Symposium of Biofunctional Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shun Nakano, Takashi Morii
2. 発表標題 Construction of tailor-made receptors and sensors from RNA-peptide complex
3. 学会等名 Lecture in Jinan University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 NAKANO, S. ; Shimizu, M.; Dinh, H.; Morii, T.
2. 発表標題 Fluorescent ribonucleopeptide sensors for selective detection of ATP and ADP
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakano, S.; Shimizu, M.; Morii, T.
2. 発表標題 Dual sensing of ATP and ADP by fluorescent ribonucleopeptide sensors
3. 学会等名 ISNAC2018/第45回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲野 瞬、森井 孝
2. 発表標題 ATP とADP を高選択的に検出する蛍光性リボヌクレオペプチドセンサー
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲野 瞬、森井 孝
2. 発表標題 RNA-ペプチド複合体を用いた蛍光性センサーの作製
3. 学会等名 生体機能関連化学部会若手の会第30回サマースクール
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲野 瞬、小西 宏明、Dinh Huyen、中田 栄司、森井 孝
2. 発表標題 酵素連続反応の効率化へ向けたナノ空間区画化技術の開発
3. 学会等名 2018年度微細構造解析プラットフォームシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nakata, E.; Nakano, S.; Rajendran, A.; Morii, T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 324
3. 書名 Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly (Chapter 8: Covalent Bond Formation by Modular Adaptors to Locate Multiple Enzymes on a DNA Scaffold)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 エネルギー理工学研究所 生物機能化学研究分野 森井研究室 ホームページ
<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/index.html>
京都大学 エネルギー理工学研究所 エネルギー利用過程研究部門 生物機能化学研究分野 森井研究室
<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------