様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2013
課題番号：２４６５５１４６
研究課題名（和文）超小型人工ペプチダーゼドメインの創成

研究課題名（英文）Development of artificial peptidase domains

研究代表者
後藤　佑樹（Goto, Yuki）

東京大学・理学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：７０５７０６０４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円、（間接経費）　　930,000円

研究成果の概要（和文）：新しい基質認識能や触媒特性を持つプロテアーゼを創成できれば、新しい分析手法や新規疾病治療法の開発に繋がるが、新規人工プロテアーゼドメインのde novoな作成に成功した事例はこれまでにない。本研究計画では、純科学的・工学的、両方の観点から高い意義を持つ、自己切断型の新規人工ペプチダーゼ（プロテアーゼ）の創成を目指した。
申請者が以前に開発した翻訳開始反応のリプログラミング法を用いて、1兆種類を超える多様性の短鎖ランダムペプチドライブラリーを合成した。目的のペプチド切断活性を有する活性種を選択する試験管内分子進化実験により、最終的に22種類の超小型人工ペプチダーゼ候補の同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：Although artificial proteases with novel substrate specificities and unique catalytic properties would have potential utility in useful analytical methods and new therapeutic approaches, de novo creation of artificial protease domain has never achieved. This program aims at development of artificial small peptidase domains, which catalyzes self-cleavage of an amide bond.
By using the translation initiation reprogramming method, a short (20-40 aa length) random peptide library with a 1013 diversity was prepared. In vitro selection experiments of active species from the resulting peptide library has provided 22 novel peptide sequences that could exhibit the desired self-cleavage activity.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ペプチド　人工酵素　試験管内分子進化

１．研究開始当初の背景

新しい基質認識能や触媒特性を持つプロテアーゼを創成できれば、新しい分析手法や、新規疾病治療法の開発に繋がる。このため、既存のプロテアーゼに変異導入し、機能改変を行う試みがこれまで積極的に行われてきた。しかしながら、実際にプロテアーゼの基質認識配列の変更に成功したケースは数例に限られており、また成功したものでも、元のプロテアーゼの基質認識に似た配列を切断するに留まっているものが多い。これらの知見からは、既存のプロテアーゼの改変により、全く新しい特性の酵素を創り出すことが困難な試みであることが示唆される。

一方で、既存の酵素を手本とせず、一から新規プロテアーゼドメインを作り出す試みとして、触媒抗体によるペプチダーゼ活性の獲得を目指した研究も行われてきた。しかしながら、エステルを加水分解する新規触媒ドメインの作成例はあるものの、アミド結合を切断するものは未だ報告されていない。これは、極めて高い安定性を持つアミド結合（中性・常温における半減期が数百年オーダー）の加水分解が、いかに難しい反応であるかを物語っている。

２．研究の目的

本研究計画では、純科学的・工学的、両方の観点から高い意義を持つ、**自己切断型の新規人工ペプチダーゼ（プロテアーゼ）の創成**を目指した。具体的には、(1)触媒活性に必要なドメインが、20-40 残基程度と超小型である、(2)触媒ドメインの N 末端側で正確に切断が起き、切断産物の末端構造が均一である、(3)特定の外部刺激により、その切断活性の ON/OFF を制御できる、といった特徴を持つ超小型ペプチダーゼドメインの創成に取り組んだ。この人工ペプチダーゼは、(図１)。この研究は、①新規プロテアーゼ触媒ドメインを人工的に創り出す、②20-40 残基長という非常に短いペプチドドメインが極めて安定なアミド結合を切断する、という二点において、純科学的な視点から大きな意義を持つ。

３．研究の方法

背景の項で述べた通り、ポリペプチド鎖を形成するアミド結合は非常に安定であり、これを小さなサイズのペプチドドメインによって、加水分解が進行する程度までカルボニル基を活性化するのは、困難が予想される。そこで本計画では、潜在的に切れやすいペプチド配列を利用することで、この障害を回避しようと考えた。具体的には、Cys-Pro-エステルの連続配列が、Cys 上での窒素原子から硫黄原子へのアシルシフトを伴って、生理条件下で自発的に切断される現象に注目した。通常 N⇔S アシルシフトの平衡はアミド結合形成側に偏っているが、Cys-Pro-エステルの場合、N⇒S アシルシフトにより生成したアミノ基が、Pro の後に続くエステル結合を攻撃してジケトピペラジンを形成できるため、自発的にアシル転移反応が進行し、チオエステルが形成される。この知見を基に、本研究計画では**ペプチドの切断サイトに Cys-Pro 配列を配置する工夫を行う**。これにより、超小型ペプチダーゼが Cys-Pro-アミド中のアミドカルボニルをほんの少し活性化するだけで、分子内のアミド交換反応が進行し、ジケトピペラジンチオエステルの形成を伴ってペプチド鎖が切断されるのではないかと期待した。

さらに本研究では、**高い多様性を誇るランダムペプチドライブラリーから目的の活性種のみを試験管内人工進化によって単離するアプローチ**を取った。これは、スクーリングに頼った従来の手法とは大きく一線を画す。この方法では、10^{13} 種類以上の独立したペプチダーゼ候補の合成と評価を数週間の実験で行うことができ、既存の手法とは比べものにならない数の配列を網羅的に試すことが可能である。

４．研究成果

・酸性条件下で活性が ON になる超小型ペプチダーゼの探索系の確立

配列中に Cys-Pro をコードする UGU-CCG、及びそれに引き続くランダム配列領域 $(NNK)_{20}$ を、C 末端に Flag ペプチドをコードした配列を含むランダム mRNA ライブラリーを用意し、ペプチダーゼ探索系の最適化を行った。この mRNA ライブラリーをピューロマイシン含有 DNA リンカーと連結した後、試験管内翻訳系を利用し、ペプチドライブラリーを翻訳合成する。この時、ビオチン化された開始残基で翻訳開始反応をリプログラミングすることで、ペプチド産物の N 末端をビオチンラベルでき、また mRNA に付加されたピューロマイシンの働きにより、翻訳産物はその配列情報をコードした mRNA 分子でタグ付けできる。合成されたペプチドライブラリーを、アビジンビーズにより精製後、pH5.0 の緩衝液を加える。この操作により、もし目的のペプチド種が存在すれば酵素活性が ON になり、ペプチド切断反応が進行することが期待される。切断により生じた mRNA でタグ付けされた C 末端側断片は、Flag 抗体固定化レジンで上清より回収する。その後、回収した配列を PCR による増幅、試験管内転写反応により、再び mRNA ライブラリーに変換する。ここで得られる mRNA ライブラリーは、スタート時と比で、よりペプチダーゼ活性の高い配列をコードした集団へと変化している。この一連のサイクルを繰り返すことで、高い自己切断活性を持つペプチド配列をコードした cDNA が、最終的に濃縮される。本成果では、モデル mRNA を用いた小スケールの実験により、上記多段階の生化学反応が試験管内で問題なく進行することを確認した。また、回収したペプチドの絶対量をリアルタイム PCR により決定し、各サイクルにおける活性

種の割合をモニタリングする方法論も確立した

・酸性条件下で活性が ON になる超小型ペプチダーゼ候補配列の同定

前項で述べたサイクルを繰り返し行い、目的の超小型ペプチダーゼの人工進化実験を行った。各サイクルにおいて、Flag 抗体固定化レジンで回収された mRNA の量をリアルタイム PCR 法により定量し、切断後に回収されたペプチド断片の割合を計算した（[回収された mRNA 量] ÷ [翻訳に用いた全 mRNA 量]）。その結果、図 1 に示した通り、8 サイクル目から回収率の上昇が見られ、10 サイクル目には 0.14%に達した。この回収率の上昇は、本研究でデザインした人工進化のスキームが設計した通りに機能し、初期のランダムペプチドライブラリーが、酸性条件下で自己切断活性を示す極小ペプチダーゼ候補の集団へと変換されたことを示す。

10 サイクル後の cDNA ライブラリーをクローニングし、その配列解析を行ったところ、別々の配列を有する、22 種類の極小ペプチダーゼ候補を同定することに成功した（紙面の都合上、全ての配列は示さない）。その中には、図 2 に示した通り、「Pro-Arg-Leu-Ile-(Ser/Thr)-Leu」という相同配列を有する複数の配列が存在した。異なるクローンにおい発見されたこの相同配列は、自己切断活性に重要な役割を果たしていることが期待される。

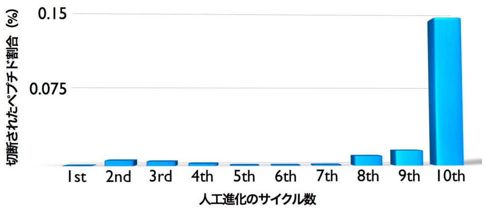

図 1　人工進化の各過程における活性種の回収率

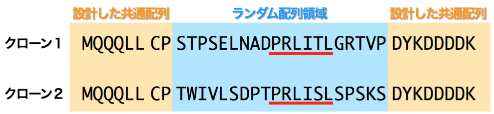

図 2　獲得された極小ペプチダーゼ候補配列の一例。ライブラリーの設計による共通配列をオレンジ色で、ランダム領域を水色で示した。赤線部は有意な相同配列を示す。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Passioura, T.; Katoh, T.; Goto, Y.; Suga, H. Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides, Annu. Rev. Biochem., 2014, in press. （査読有り・10.1146/annurev-biochem-060713-035456）

2. Goto, Y.; Iseki, M.; Hitomi, A.; Murakami, H.; Suga, H. Nonstandard peptide expression under the genetic code consisting of reprogrammed dual sense codons, ACS Chem. Biol., 2013, 8, 2630-2634. （査読有り・10.1021/cb400549p）

3. Fujino, T.; Goto, Y.; Suga, H; Murakami, H. Reevaluation of the D-amino acid compatibility with the elongation event in translation, J. Am. Chem. Soc., 2013, 135, 1830-1837. （査読有り・10.1021/ja309570x）

4. Goto, Y.; Suga, H. Flexizymes as a tRNA acylation tool facilitating genetic code reprogramming, Methods Mol. Biol., 2012, 848, 465-478. （査読無し・10.1007/978-1-61779-545-9_29）

〔学会発表〕（計 7 件）

1.後藤佑樹、山岸祐介、加藤敬行、菅裕明、“改変翻訳反応を用いた特殊環状ペプチドの合成”、日本化学会第 94 春季年会、特別講演、2014 年 3 月 27-30 日（名古屋）

2.村上直央、後藤佑樹、加藤敬行、Kun Yang、William Bozza、Zhihao Zhuang、菅裕明、“人工環状ペプチドは核内増殖抗原 PCNA を細胞内で阻害する”、第 16 回生命化学研究会、2014 年 1 月 9-10 日（熱海）

3.後藤佑樹、“人工生合成系による特殊ペプチドの合成”、第 45 回若手ペプチド夏の勉強会、招待講演、2013 年 7 月 28-30 日（八王子）

4.山口淳、山岸祐介、後藤佑樹、加藤敬行、菅裕明、“N-アルキルアミノ酸含有大環状擬天然ペプチドライブラリーからの HECT 型 E3 ユビキチン転移酵素 Smurf2 阻害剤の探索”、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11-14 日（福岡）

5.村上直央、後藤佑樹、山岸祐介、加藤敬行、William Bozza、Kun Yang、Zhihao Zhuang、菅裕明、“酸化的カップリング反応により環状化したペプチドの in vitro セレクション”、第 49 回ペプチド討論会、2012 年 11 月 7-9 日（鹿児島）

6.Xiao Song、Kibom Kim、Sunghoon Kim、加藤敬行、後藤佑樹、菅裕明、“In vitro

selection of macrocyclic peptides against human aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting protein-1"、第 49 回ペプチド討論会、2012 年 11 月 7-9 日（鹿児島）

7.後藤佑樹、菅裕明、"翻訳合成系を用いた新規生理活性ペプチドの探索"、BIA Symposium2012、招待講演、2012 年 7 月 20 日（東京）

〔図書〕（計 2 件）
1.伊藤悠美、後藤佑樹、菅裕明、"最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用（第 3 章 4 節）"、メディカルドゥ、2012 年、125-130.

2.加藤敬行、後藤佑樹、菅裕明、"生命システム工学（第 5 章）"、化学同人、2012 年、71-100.

６．研究組織
(1)研究代表者
後藤　佑樹（GOTO YUKI）
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号： 70570604