

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24656510

研究課題名（和文） 化学拡張進化分子工学によるペプチド触媒の探索

研究課題名（英文） Screening of peptide catalyst by chemically extended molecular evolutionary engineering

## 研究代表者

伊藤 嘉浩 (ITO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号：40192497

## 研究成果の概要（和文）：

化学拡張進化分子工学により、有機溶媒共存下で触媒作用をもつペプチド配列の探索を目指した。ターゲットする触媒反応は、生化学工業でも有用なアルドール縮合反応とした。進化分子工学手法には、一方の反応基質を担持した tRNA と、反応生成物を回収できるような他方はビオチン化した基質を各々合成し、有機溶媒中でも安定な表現型—情報型分子の錯体を共有結合で形成できる mRNA ディスプレイ法を用い、有機溶媒中で触媒できるペプチドの探索を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

Peptide which catalyzes a reaction in organic solvents was screened by chemically extended molecular evolutionary engineering. The target reaction was Aldol condensation which is important for biochemical industry. We prepared two substrates; one is conjugated with tRNA and another conjugated with biotin molecule for recovery. Peptide catalyst was screened by molecular evolutionary engineering using mRNA display which is tough even in organic solvent due to covalent linking between peptide (phenotype) and mRNA (genotype).

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：生物工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：分子進化工学、mRNA ディスプレイ、ペプチド触媒、ミスアシル化 tRNA、アルドール縮合

## 1. 研究開始当初の背景

核酸系の進化分子工学の手法が 1990 年に報告されて以来 20 数年をへて、数々の人工的なリボザイムだけでなく、DNAzyme デオキシリボザイムも人工的に合成されるようになってきた。一方、ペプチド系の進化分子工学は、フェージディスプレイに代表されるように生体系に戻して増幅する必要があり、分子レベルでの人工系を構築することが困

難であった。しかし、1990 年後半からリボソームディスプレイや mRNA ディスプレイなどが可能となり、無細胞翻訳系を用いたランダム入れるライブラリーが可能となり、展開されるようになってきた。核酸系に比べ、多様な官能基をもつペプチド系を用いることで、様々な人工機能化が期待できるにもかかわらず、プロセスが複雑で多くの要素技術が必要とすることから、大きな進展が難しか

った。

しかし、最近になっていくつかの研究グループから非天然アミノ酸を組み込んだペプチド・アプタマーの研究が、酵素阻害剤を中心に報告されるようになってきた。我々に研究グループでは、進化分子工学は、これまでのホスト・ゲスト化学に、従来を超えた任意の分子認識を生み出せる新技術としてとらえ、学問的に新たなホスト・ゲスト化学、超分子化学を切り拓くべく研究を進めてきた。これまでに蛍光発生型アプタマー、光応答性アプタマーなどを可能にしてきた。

そのような中、本研究では、新たな展開としてペプチド触媒の探索を目指した。

## 2. 研究の目的

ペプチド進化分子工学により、有機溶媒共存下で触媒作用をもつペプチド配列の探索を目指した。

本研究は、第一に重要な点は、進化分子工学でペプチド触媒を探索する世界初の試みである。そのため、反応ターゲットは、生化学工業でも有用なアルドール縮合反応とし、これを触媒できるようなペプチドの探索を行った。

第二に本研究では世界で初めてスクリーニング過程を有機溶媒中で行うことを企画し、有機溶媒中でも安定な表現型—情報型分子の錯体を形成できる mRNA ディスプレイ法を用いた。

有機溶媒中で選別を行えるようにすることにより、ペプチド触媒の「釣り上げ」確率が増し、なおかつ成功すれば画期的な成果になると期待した。

## 3. 研究の方法

全体の進化分子工学プロセスを Fig. 1 に示す。まず、ランダム配列 DNA を調製し、そこから転写反応でランダム配列 mRNA を調製した。ここに、非天然アミノ酸を担持した tRNA 存在下で無細胞翻訳を行い、非天然アミノ酸を含むランダム配列ペプチドを調製した。この選別プロセスでは、ピューロマイシンを用いた mRNA ディスプレイ法を使い、情報を担う mRNA と表現型ペプチドを共有結合で連結させた。

両者をジメチルホルムアルデヒド存在下で混合・反応させた後、自己触媒作用で縮合してビオチン化されたペプチドをアビジン・ビーズで釣り上げた。採取したペプチド・mRNA 複合体から mRNA を RT-PCR で転写・増幅し次のサイクルを行う。そしてまたセレクション・サイクルを行った。このサイクルを繰り返す、最終的に、RT-PCR した生成物からサブクローニングを行い、配列を決定した。

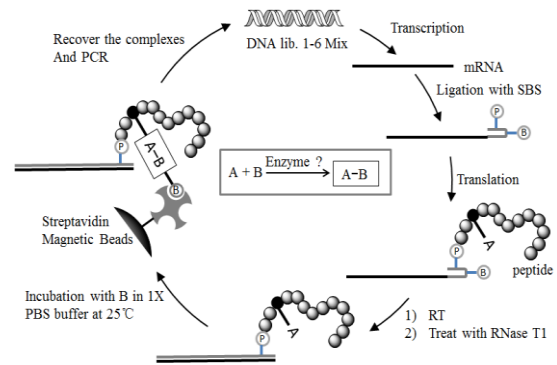


Fig. 1 進化分子工学プロセス。

アルドール反応は  $\alpha$  位に水素を持つカルボニル化合物が、ジケトンと反応して  $\beta$ -ヒドロキシカルボニル化合物が生成する反応である。本研究では Fig. 2 に示す反応を触媒するペプチドを探索することを目指した。

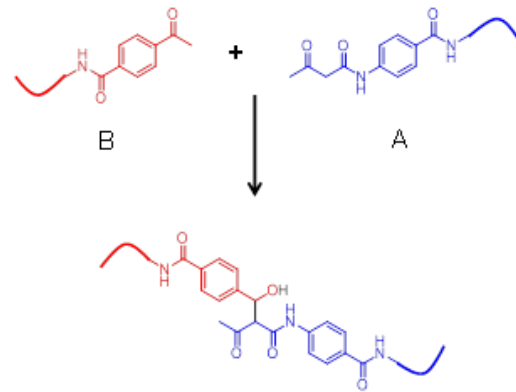


Fig. 2 ターゲット反応としたアルドール縮合。ジケトン体の A 側をランダム配列ペプチドにつけ、B 側をビオチン化した。反応が進行するとペプチドがビオチン化され、アビジンで釣り上げることができる。

具体的には、一方の基質ジケトン体は tRNA にミスアシル化することで担持させ、無細胞翻訳系に添加することで、ランダム配列 DNA の転写物からランダム配列ペプチド・ライブラリーを調製した。他方の  $\alpha$  位に水素を持つカルボニル化合物はスペーサーを介してビオチン化した。ジケトン体を側鎖にもつグルタミン酸の合成を Fig. 3 に、それを担持した tRNA の調製法を Fig. 4 に示す。ビオチン化基質の合成法は Fig. 5 に示す。

ジケトン体結合グルタミン酸は、活性化後、ジヌクレオチド pdCpA に結合し、この 2 塩基分を短縮した tRNA にリガーゼ反応を用いて導入した。



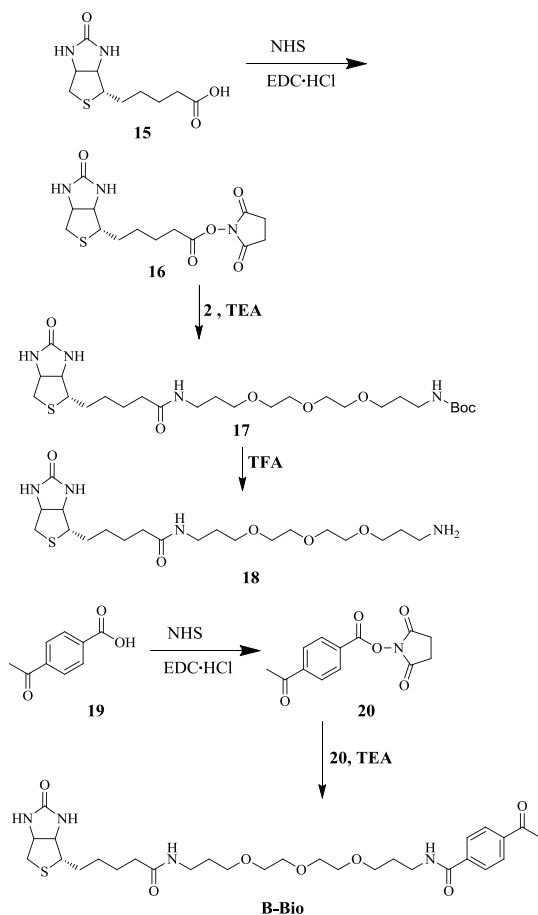


Fig. 5 ビオチン化基質合成法

サイクルを3回繰り返し、最終的に、RT-PCRした生成物からサブクローニングを行い、配列を決定することができた (Tab. 1)。

Tab. 1 Fig. 1のサイクルを3回繰り返し、得られたペプチド配列。

BALHPBYGPLGVC	VVVTLSVSSYDB
BYAIFFDTYCDQA	VDAPNLBVYNCYG
BVLGGAGFCFRGF	BHCVSGGFCPLSV
RFGLIBFGAQLQ	ISIFFCBGIRHTG
BGGEGFCVGDGGH	BRDSAVRPGHGIG
BYSIHCGLELYGG	LVGRREBVHGCKH
AVCSGAASICLDB	SVEGKDBVFSLVA
BRRQLGGCVGRYS	FFVVVYRFGPIAB
GRVVAYBLDRCVT	SGVCGCFEFCFLB
GCBFGIVFGGVRB	TSGALYBRSDPAR
PPSSGPBCDHGVG	BACSSSYVYTHSF
BVSAIKPVGLVRV	BGBGDLTFCFSLP

BESVYFSFDVSNC	BFGVLGYVYGDVA
NHGGYSBVCNLYL	VNDEFLLBSSRRGP
BFNSHGRSVHIPF	RGLGVTBYGVSYR
DGAVHVBTBGFRF	SVVFSRBFGEAYB
TVLVLVCTFGHVB	BVACSCVNLVVRR
ARDICFTGGCVLB	TSECGSBGPDSPN
IEIVLSBDDYLFA	RLFPGYBYCGLYV
VDAPNLBVYNCYG	SVTSLDAVAGALB
SVLVDGACVGGVB	QGGSVQBDVIBYC
FAFVVGFCVSSB	VPNVFVALSGCCB
ICSFVSBFGIRGG	GVGKCNBPCVYRV
BRFGGSCFNHSGV	

まだ複数の重複配列のクローンが得られる段階にはなく、現在、選別プロセスを進めている。重複配列が見つかった段階で、実際にペプチドを合成し、その触媒活性を検討する。

このような研究を進める一方、これらプロセスを可能にする要素技術の研究も進め、これらは論文として発表した。一つは、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を載せた tRNA を調製し、無細胞翻訳系で部位特異的に PEG 鎖が導入可能か否か検討する研究で、分子量 1000 程度までは可能であることが実証された。

もう一つは天然核酸からなる DNAzyme が有機溶媒中で触媒活性を保持するか否かの検討である。DNAzyme に PEG 鎖を導入することで有機溶媒への可溶性ができ、可溶性となった DNAzyme は触媒活性を持つことができたことを報告した。有機溶媒中で働く生体触媒に関する重要な知見を得ることができた。

#### 4. 研究成果

進化分子工学過程における有機溶媒使用は初めてであるとともに、機能性分子の探索のために非天然アミノ酸を用いたペプチド進化分子工学を用いることも世界初の試みである。今後本研究を進めることにより、有機合成化学と進化分子工学を融合した全く新しい「バイオものづくり」領域が展開できると期待でき、温和で精緻 (特異的) な化学反応を可能にし、産業上も重要になることが期待できる。

#### 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 2 件)

- ① Seiichi Tada, Takashi Andou, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Eiry Kobatake, and Yoshihiro Ito, "Genetic PEGylation", PLoS ONE, e49235 (2012)、査読有
- ② Hiroshi Abe, Naoko Abe, Aya Shibata, Keiji Ito, Yoshiyuki Tanaka, Mika Ito, Hisao Saneyoshi, Satoshi Shuto, and Yoshihiro Ito, "Structure Formation and Catalytic Activity of DNA in Organic Solvents", Angewandte Chemie International Edition, 51, 6475-6479, (2012)、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kubo I, Hoshino Y, Liu Mingzhe, Abe Hiroshi, Ito Yoshihiro, "Peroxidase Activity of G-Quadruplex Hemin-Binding DNA Aptamers Determined by Electrochemical Measurement", Prime 2012, Honolulu, USA, 2012 10
- ② Ito Yoshihiro, "PEGylated antibody and DNA in organic media", 244th ACS National Meeting, Philadelphia, USA, 2012 8

[図書] (計 1 件)

- ① Seiichi Tada, Hiroshi Abe, and Yoshihiro Ito, "PEGylated Antibodies and DNA in Organic Media and Genetic PEGylation" in "Green Polymer 2." ed. by H. N. Chen and R. A. Gross, ACS, accepted (2013)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 嘉浩 (ITO YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号：40192497

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

王 偉 (Wang Wei)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・特別研究員

研究者番号：30632955

多田 誠一 (Tada Seiichi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・特別研究員

研究者番号：30598165

鶴澤尊規 (Uzawa Takanori)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・研究員

研究者番号：60554376

阿部 洋 (Abe Hiroshi)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号：80415067