

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：15K13751
研究課題名(和文) リボソームによるリン-窒素間の結合形成

研究課題名(英文) P-N bond formation in ribosome

研究代表者

川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60638881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミノホスホン酸ジニトロベンジルエステル体とtRNA類似体融合RNAライブラリーを用いた試験管内分子進化により、tRNAをアミノホスホン酸でアシル化する新規リボザイム(tRNAアミノホスホニル化リボザイム)の発見に成功した。また、同定したリボザイムを用いて調製したアミノホスホニルtRNAにより、既存の野生型リボソームは、リン-窒素間結合であるホスホノペプチド結合の形成は触媒しないことを実証することに成功した。

研究成果の概要(英文)：By in vitro selection using aminophosphonic acid 3, 5-dinitrobenzyl and tRNA analog-fused RNA library, we successfully identified a novel ribozyme that catalyzes tRNA-aminophosphonylation. By using aminophosphonyl-tRNA prepared by the identified ribozyme, we also successfully demonstrated that existing wild-type ribosome could not catalyze phosphono-peptide bond formation, P-N bond formation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：リボソーム リボザイム アミノホスホン酸 アミノホスホニル化 tRNA ホスホノペプチド 分子進化 リン-窒素間の結合形成

1. 研究開始当初の背景

リボソームは、アミノアシル tRNA とペプチジル tRNA を基質として用いて、ペプチド (アミド) 結合を形成する生体触媒である。このリボソームのアミノ酸基質は通常 20 種類の天然アミノ酸であるが、無細胞翻訳系と人工的に調製したアミノアシル tRNA を用いることによって、様々な側鎖構造を持つ非天然アミノ酸を含むペプチド結合形成が触媒可能であることが示されてきている (Kawakami *et al.*, *J. Nucleic Acids* 713510, 2012)。更に、リボソーム内で、エステル結合 (Rich *et al.*, *Science* 1971, Sando *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2007) やチオエステル結合 (Ellman *et al.*, *Science* 1992) が形成可能であることが報告されているように、様々な求核種を用いる研究が報告されている。その一方で、求電子種をカルボン酸以外に変えることが可能か検証した例は未だ報告されていない。

そのような中、これまでに研究代表者は、人工的に調製した N アルキルアミノアシル tRNA を用いることによって、リボソーム内での N アルキルアミド結合形成技術の開発に精力的に取り組んできた (Kawakami *et al.*, *Chem. Biol.*, 15, 32, 2008, Kawakami *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 16861, 2008, Kawakami *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 12297, 2013, Kawakami* *et al.*, *Chem. Sci.*, 5, 12297, 2014)。更に、*in vitro* virus 法 (mRNA ディスプレイ法) と組み合わせることにより、N アルキルペプチドの数十兆種類の大規模ライブラリーからセクション・スクリーニングを行い、薬剤候補となる N アルキルペプチド阻害剤の発見へと工学応用することにも成功してきた (Kawakami *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 8, 1205, 2013, *Chem. Biol.*, 18, 1562-1570, 2011)。また、再構成型の無細胞翻訳系 (PURE システム) を用いることにより、高効率かつ高純度なエステル結合の形成をリボソーム内で実現し、翻訳ペプチドの環状化技術へと応用することにも成功してきた (Kawakami *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 5, 888, 2009)。

2. 研究の目的

これまでリボソーム内での結合形成反応においてアミノ基以外の様々な“求核種”を用いる研究が取り組まれてきたが、本研究では“求電子種”の方を変えることが可能であるか検証する。具体的には、カルボン酸の代わりにホスホン酸を持つ tRNA を調製する技術を開発し、リボソーム内でリン・窒素間の結合形成が可能であるか検証する。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまでの研究で (*Chem. Sci.*, 5, 12297, 2014)、N アルキルアミノ酸を始めとするアミノ酸と tRNA の連結には

アミノ酸の 3,5-ジニトロベンジルエステル (DBE) 誘導体とアミノアシル化リボザイムを用いてきた。そこで、アミノアシル化リボザイムを開発した過去の研究と同様の分子進化工学的手法を用いて、tRNA をアミノホスホン酸 DBE でアミノホスホン化するリボザイムの開発を行なった。

4. 研究成果

まず、アミノホスホン酸の DBE 体を化学合成し、アミノアシル化リボザイムを用いて tRNA のアミノホスホン化を試みた。その結果、既存のアミノアシル化リボザイムはアミノ酸、すなわち、カルボン酸用に最適化されており、アミノホスホン酸 DBE を基質としないことが判明した。

モノエステル型のアミノホスホン酸 DBE は中性付近水溶液中で負電荷を持つため、リンへの求核置換反応であるアミノホスホン化反応は進行しにくい、すなわち、モノエステル型のアミノホスホン酸 DBE の加水分解反応は非常に進行しにくいことが判明した。そこで、アミノホスホン化リボザイムの分子進化の実験は、モノエステル型のアミノホスホン酸 DBE に加えて、ジエステル型のアミノホスホン酸 DBE を併せて用いて行なった。

アミノホスホン化リボザイムの分子進化実験に用いる RNA ライブラリーは、既存のアミノアシル化リボザイムの tRNA 結合ドメインを残し、アミノ酸 DBE 認識ドメインをランダム RNA に置換したライブラリーを用いた。また、ランダム RNA ライブラリーの 3' 末端に polyA リンカーを介して tRNA (受容ステム) ドメインを連結することにより、アミノホスホン酸 DBE でアミノホスホン化を触媒するリボザイムドメインを持つ RNA (活性種) のみがアミノホスホン酸でラベルされるようにした。次にビオチン NHS でアミノ基選択的にビオチン化することにより活性種をビオチンラベルした。ここで、ビオチン化を変性条件化で行うことにより、ビオチン化を触媒するリボザイムが得られるリスクを軽減させた。続いて、ストレプトアビジン磁気ビーズに活性種を固定化し、アミノホスホン化活性を持たない非活性種の RNA を除去した。また、ストレプトアビジン結合 RNA アプタマーなどが得られないよう、変性剤を用いて stringent にビーズの洗浄を行なった。次に、3' 末端選択的にアミノホスホン化を触媒するリボザイムが得られるよう、巨大なストレプトアビジン磁気ビーズに固定化させたまま RNA の逆転写反応を行い、3' 末端以外にアミノホスホン化するリボザイムドメインを持つ RNA に逆転写がかからないようにした。最後に PCR・転写により活性種を増幅して、次のラウンドに使用した。各ラウンドにおいて、ストレプトアビジンプルダウン前後の RNA の回収率を定量的 PCR によりモニタリングした結果、RNA 回収率の上昇が観察された。そこで、回収率の上昇が観察された RNA

ライブラリーのクローニング及び配列解析を行なった。その結果、数種類の RNA への配列収束を観察することができた。また、各クローン RNA について、0-メチル-ホスホン酸-3,5-ジニトロベンジルエステルの反応、および、アミノ基選択的ビオチン化を介した、固定化ストレプトアビジンの高い回収率での回収、ならびに、ストレプトアビジン依存のゲルシフトアッセイによるバンドのシフトを観察することもできた。更に、最も高い回収率とゲルシフト率を示したクローン RNA について、その反応は、0-メチル-ホスホン酸-3,5-ジニトロベンジルエステル依存的、かつ、RNA3'末端のジオール構造依存的であることも判明した。従って、0-メチル-ホスホン酸-3,5-ジニトロベンジルエステルを基質として、tRNA ドメインの 3'末端のジオール選択的にアミノホスホニル化を触媒する新規リボザイムの同定に成功した。更なる解析の結果、この tRNA アミノホスホニル化リボザイムは様々な tRNA を基質にすることが判明した。

同定したアミノホスホニル化リボザイムを用いて tRNA にアミノホスホン酸を連結した。このアミノホスホニル tRNA を、モデルペプチド翻訳合成用の鋳型 DNA とともに、無細胞転写・翻訳系に加え、翻訳反応液を質量分析で解析することにより、ホスホノペプチド結合が形成されているかどうか判定した。その結果、ホスホノペプチド結合は形成されていないことが判明した。次に、アミノホスホニル tRNA による翻訳の開始は可能であるかどうか検証した。翻訳開始過程は、一般的に、翻訳伸長過程より高い基質許容性を示すことが知られており、アミノ基を N アシル化すると翻訳開始効率が向上することも知られている。そこで、翻訳開始の評価には、アミノ基が N アシル化 (ビオチン化など) されたアミノホスホニル tRNA を用いて行なった。その結果、ホスホノペプチド結合は形成されていないことが判明した。

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 7 件)

- ① Mizuki Yamamoto, Hiroki Suzuki, Tomohiro Iwabuchi, Yu Shimizu, Takashi Kawakami
Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System
Peptide Science, 54, in press, 2017
査読有り
- ② Takashi Kawakami, Koji Ogawa, Tomohisa Hatta, Naoki Goshima, and Tohru Natsume

Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor
ACS Chemical Biology, 11, 1560-1577, 2016
DOI: 10.1021/acscchembio.5b01014
査読有り

- ③ Miya Kurata, Naoko Yanada, Koichiro Ikai, Daiki Sakamoto, Takashi Kawakami
De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System
Peptide Science, 53, 227-228, 2016
査読有り
- ④ Naoko Yanada, Miya Kurata, Daiki Sakamoto, Koichiro Ikai, Takashi Kawakami
Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging
Peptide Science, 53, 207-208, 2016
査読有り
- ⑤ Takashi Kawakami, Koji Ogawa, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
De novo creation of peptide tags for non-enzymatic covalent labeling by *in vitro* evolution for protein imaging inside living cells
Chemistry & Biology, 22, 1671-1679, 2015
DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.10.016
査読有り
- ⑥ Takashi Kawakami, Shinya Ito, Naoki Goshima, Kazuhiro Nagata, and Tohru Natsume
Post-translational modification mapping of collagen that binds to HSP47 by directed ligand evolution and DNLC mass spectrometry
Peptide Science, 52, 321-322, 2015
査読有り
- ⑦ Takashi Kawakami, Kazuma Murakami, Daiki Sakamoto, Mizuho Hanaki, Tohru Natsume, and Kazuhiro Irie
In vitro display evolution of cyclized peptidomimetics targeted to a chemically synthesized amyloid beta protein dimer
Peptide Science, 52, 323-324, 2015

査読有り

[学会発表] (計 12 件)

- ① 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、川上隆史
Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System
日本ペプチド学会第 54 回ペプチド討論会
2017 年 11 月 21 日
平塚中央公民館 (大阪府堺市)
- ② 川上隆史
Chemistry から Biology への展開 -DIVERSE スクリーニングシステムの開発とバイオイメージングへの応用-
日本化学会第 97 春季年会 (招待講演)
2017 年 3 月 17 日
慶応義塾大学 (神奈川県横浜市)
- ③ 川上隆史
DIVERSE システムを用いた蛋白質ラベリング用ペプチドタグ創製とバイオイメージングへの応用
第 7 回「産と学をつなぐ SENRI の会」(招待講演)
2017 年 1 月 13 日
千里ライフサイエンスセンタービル (大阪府大阪市)
- ④ 倉田みや、築田奈央子、猪飼航一郎、坂本大樹、川上隆史
De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System
日本ペプチド学会第 53 回ペプチド討論会
2016 年 10 月 27 日
京都テルサ (京都府京都市)
- ⑤ 築田奈央子、倉田みや、坂本大樹、猪飼航一郎、川上隆史
Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging
日本ペプチド学会第 53 回ペプチド討論会
2016 年 10 月 27 日
京都テルサ (京都府京都市)
- ⑥ 川上隆史
試験管内分子進化法を用いた PPI 阻害環状 N アルキルペプチド化合物の創製
新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム～天然物
- ケミカルバイオロジーの更なる発展を目指して～ (招待講演)
2016 年 2 月 23 日
京都大学 (京都府京都市)
- ⑦ Takashi Kawakami, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Directed evolution of antibody-like peptides for proteomics
The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies
2015 年 12 月 15 日
Honolulu (USA)
- ⑧ 川上隆史、伊藤進也、五島直樹、永田和宏、夏目徹
無細胞分子進化法と超高感度質量分析を用いた翻訳後修飾の網羅的解析
日本ペプチド学会第 52 回ペプチド討論会
2015 年 11 月 16 日
平塚中央公民館 (神奈川県平塚市)
- ⑨ 川上隆史、村上一馬、阪本大樹、花木瑞穂、夏目徹、入江一浩
アミロイド β 二量体を標的とする非天然型環状ペプチドの試験管内分子進化
日本ペプチド学会第 52 回ペプチド討論会
2015 年 11 月 16 日
平塚中央公民館 (神奈川県平塚市)
- ⑩ 川上隆史
進化分子工学と有機合成化学を基盤とするペプチドツール創製システムの構築
BioJapan2015 World Business Forum (招待講演)
2015 年 10 月 15 日
パシフィコ横山 (神奈川県横浜市)
- ⑪ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
タンパク質ラベリング用ペプチドタグの進化分子工学的創製システムの構築
日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会
2015 年 6 月 10 日
東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑫ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
プロテオミクスアプローチによるタンパク質間相互作用阻害剤の同定
「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 8 回公開シンポジウム
2015 年 6 月 8 日
東北大学 (宮城県仙台市)

[図書] (計 2 件)

- ① 山本美月、川上隆史
羊土社

実験医学 2018 年 1 月号、News & Hot Paper
Digest、pp62-63、2018
2 種類の人工塩基を有する DNA アプタマ
ー

- ② 山本美月、鈴木宏輝、岩淵智宏、清水優、
川上隆史
技術情報協会
ペプチド医薬品開発のためのスクリーニ
ング・安定化・製剤化技術 第9章-第4
節、pp332-342、2017
細胞膜透過性ペプチド創製を指向した
PURE システムと mRNA ディスプレイ法に
よる大環状 N アルキルペプチドの超高速
スクリーニング

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：任意の標的物質と共有結合可能な（ポ
リ）ペプチド／タンパク質タグの選択方法及
び選択されて得られた（ポリ）ペプチド／タ
ンパク質タグ
発明者：川上隆史、夏目徹
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-160191
出願年月日：平成 27 年 8 月 14 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
[http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/k
enkyu/index.php?content_id=20](http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content_id=20)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：60638881

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし