

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K19212

研究課題名（和文）ポリメラーゼ・ヌクレアーゼ活性変換因子の開発

研究課題名（英文）Development of a peptide selection system to modulate polymerase functions

研究代表者

田上 俊輔（Tagami, Shunsuke）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40586939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の動態を自由に操ることは生物学の究極的課題の1つである。そこで本研究では、細胞内での核酸合成・分解を自由に制御することを目指し、ポリメラーゼをヌクレアーゼに変換するペプチドの開発に挑戦した。そのために、mRNA display法を改良し、ヌクレアーゼ反応が起きたときのみペプチドが回収されるスクリーニングを実現した。今後、本スクリーニング系を様々なポリメラーゼに応用することで、有用なペプチドの取得を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な病原体（ウイルス、がん細胞など）の増殖にはその遺伝情報を増幅するためのポリメラーゼが必要です。本研究ではそのようなポリメラーゼの機能を変換し、むしろ病原体の遺伝情報を破壊するようにするためのペプチド開発を進めています。研究期間中に複雑なペプチドスクリーニング法の改変を行いました。今後これを利用して様々な有用ペプチドの取得を目指しています。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop a peptide selection system to convert polymerases into nucleases. For this purpose, we modified the mRNA display method and realized screening in which peptides were recovered only when a nuclease reaction occurred. We aim to obtain useful peptides by applying this screening system to various polymerases in the future.

研究分野：合成生物学

キーワード：ペプチド ポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

一般的なポリメラーゼ、ヌクレアーゼの反応機構・活性部位はよく似ている(図1)。よって、何らかの因子を付加することによって、ポリメラーゼの活性部位をヌクレアーゼの活性部位に変換できる可能性はある。これはすなわち、ピロリン酸を認識するポリメラーゼの活性部位を、水酸化物イオンを認識するように調整するということである。水酸化物イオンはピロリン酸よりも小さいので、人工因子によって活性部位の空間を埋めることが出来れば、このような活性変換は可能であると考えられる。

実際に、転写のプルーフリーディングに関わる転写因子がそのような「活性変換」能力があることが知られている。バクテリアの **Gre-factor** や真核生物の **TFIIS** といった転写調節因子は、それ自体は活性部位を持たないが、ループ構造を RNA ポリメラーゼの活性部位に差し込むことで、ポリメラーゼの活性部位を変形させて、RNA の加水分解を触媒させる。申請者は過去の研究で、**Gfh1 (Gre-factor homolog1)** と RNA ポリメラーゼの複合体の結晶構造解析に成功しており、このような転写因子による RNA ポリメラーゼの活性部位の変形機構の解明に大きく貢献してきた (Tagami S, et al., Nature, 2010)。このような構造的知見はウイルス由来のポリメラーゼ等に対する **Gre-factor** 様ペプチドを開発する際にも大きな手助けになると期待される。

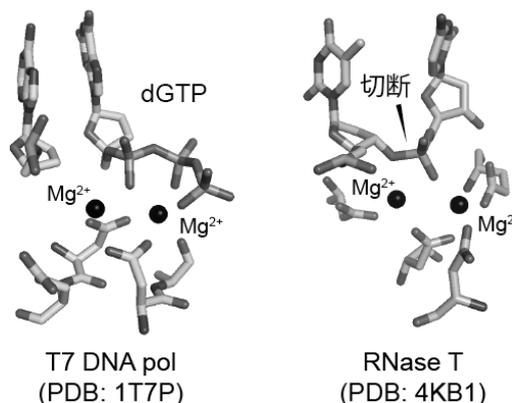


図1. 一般的なポリメラーゼとヌクレアーゼの活性部位の比較

2. 研究の目的

テロメラーゼやウイルス由来のポリメラーゼは癌細胞やウイルスの生存に決定的な役割を持つことから、これまでに多くの阻害剤が開発されている。もし核酸合成を阻害するだけでなく、積極的にテロメアやウイルスゲノムを破壊できれば、単純な核酸合成阻害剤などよりも強力に癌細胞やウイルスを攻撃できる可能性がある。例えばテロメラーゼ阻害剤によってテロメア合成が止まったとしても、癌細胞の増殖が止まるまでには、癌細胞が何回もの細胞分裂によってテロメアを使い切るのを待たねばならない。そこで癌細胞特異的にテロメアを分解する因子を開発できれば、より効果的に癌細胞の増殖を抑えることができるだろう。

癌細胞特異的にテロメアを分解するような複雑な機能を持った因子の開発は容易なことではないと考えられるが、生体内をよく見渡せば「癌細胞特異的テロメア分解酵素」によく似た酵素があることに気づく。それはテロメラーゼ自身である。テロメラーゼは悪性の癌細胞特異的に活性があり、細胞内でテロメアを見つけて活性部位に配置する能力がある。さらに一般的なポリメラーゼ・ヌクレアーゼ反応に共通して必要な **Mg²⁺** イオンを活性部位に配位する能力も持ち合わせる。もしポリメラーゼの活性部位に作用してヌクレアーゼ活性を持たせるようなペプチドを開発できれば、そのようなペプチドを用いて癌細胞のテロメラーゼ自身に癌細胞を攻撃させることができる。これと同様なことがウイルスに感染した細胞にも言える。ウイルス由来のポリメラーゼの活性部位をヌクレアーゼに変形させてしまうようなペプチドを開発できれば、ウイルス感染に対する新しい対処法になりうる。

3. 研究の方法

機能性ペプチドのスクリーニングの手法の確立のために、mRNA display 法を改良したペプチドスクリーニング法を開発した。まず、ペプチドの発現と mRNA との複合体の形成は通常の mRNA display 法と同様に行った。mRNA display では mRNA の 3' 末端を puromycin 修飾し、その修飾 mRNA を無細胞翻訳系によって翻訳することで、puromycin と合成されたペプチドが結合する (Nemoto N., et al., FEBS Letters, 1997; Roberts R., et al., PNAS, 1997)。本研究では次に mRNA の逆転写を行うが、この際に逆転写のプライマーは標的ポリメラーゼによるポリメラーゼ (ヌクレアーゼ) 反作用のテンプレート鎖とリンクしたものを使用した。ここで標的ポリメラーゼを加えたのちに、ヌクレアーゼ活性依存的にペプチドを回収する系を工夫した。

4. 研究成果

テストケースとして、T7RNAポリメラーゼの活性を変換するペプチドのスクリーニングをすすめた。mRNA display 法を改良することで、ヌクレアーゼ反応が起きたときのみペプチドが回収されるスクリーニング系を実現した。ネガティブコントロールのペプチド回収量を 0.01%に抑えることに成功しており、今後、本スクリーニング系を様々なポリメラーゼに応用することで、有用なペプチドの取得を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shunsuke Tagami
2. 発表標題 Peptide engineering for therapeutic applications
3. 学会等名 The 4th RIKEN / Karolinska Institutet / SciLifeLab Joint Symposium
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------