

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19750152  
 研究課題名（和文）金属錯体+蛋白質ハイブリッド反応場の構築による人工金属酵素の創生  
 研究課題名（英文）Construction of a new reaction field by hybrid of metal complex and protein scaffold for creation of artificial metalloenzymes  
 研究代表者 和田 章 (WADA AKIRA)  
 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：90443051

## 研究成果の概要：

金属酵素の活性中心機能を模倣する金属錯体と蛋白質の設計と合成を行うと共に、生命分子の誕生と進化の過程を人工的に再現した「試験管内分子選択・進化システム」を独自に開発した。そして、このシステムの利用により、膨大なペプチドライブラリーの中から、金属酵素様の触媒機能を発現する人工ペプチドの選択に至った。これにより、金属錯体形成・基質分子認識・触媒機能を同時に発現する人工金属ペプチド酵素の新たな創生法の確立に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,700,000	0	1,700,000
平成20年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

## 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・蛋白質・金属錯体・金属酵素・進化分子工学・試験管内分子選択

## 1. 研究開始当初の背景

近年の X 線結晶構造解析・遺伝子クローニング技術の進展により、これまで不可能とされてきた人工金属酵素の創造が現実味を帯びてきた。例えば、酸素貯蔵蛋白質ミオグロビンのヘム周辺のアミノ酸を部位特異的に置換することで、人工ヘム酸化酵素へと改変した研究を皮切りに(J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 6556.)、平面型 Cu フタロシアニン錯体を血清アルブミンに取り込ませることで、Diels-Alder 反応を触媒する人工金属酵素を創製した研究も報告された(Angew. Chem.

Int. Ed. Engl. 2006, 45, 2416.)。この研究で興味深い点としては、本来触媒機能を示さない天然蛋白質の立体構造でさえ、触媒中心となる金属イオン・金属錯体の位置を固定化することができれば、立体選択性の高い触媒反応を発現させることができることである。しかし、すでに成熟した三次元的蛋白質構造を目的に適った生体反応場として利用する場合、分子レベルで認識できる反応基質の種類は限られているだけでなく、適用できる金属錯体も、平面型ポルフィリン誘導体に限定されているのが現状である。

それゆえ、多様な基質分子の認識機能と目的の物質変換反応を触媒する人工金属酵素を創出する新たな手法の開発により、目的に適った機能性生体触媒を自在に創製する進化分子工学的研究が期待されるようになった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、触媒活性中心となる金属イオンの電子的・立体的特性を制御する人工配位子の合成や特殊アミノ酸の選定を検討すると共に、それらによって形成される金属錯体を固定化する足場として、ポリペプチド・蛋白質を構築し、望みの分子認識の発現と触媒機能を促進するアミノ酸配列を最適化する「試験管内分子選択・進化システム」を構築することを目的とした。そして、これまでに例のない人工金属酵素の試験管内創生の実現に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

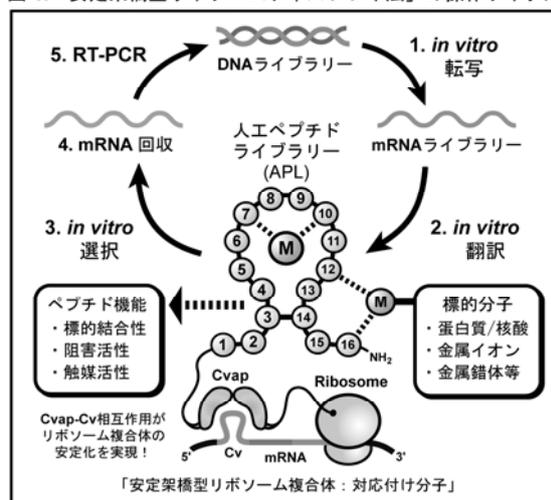
初めに、人工金属酵素の活性中心となる金属イオンの電子特性とその配位構造を制御するため、多座キレート配位子を新規に設計し、非ヘム系銅錯体・鉄錯体を系統的に合成した。さらに、それらの分光学的・物理化学的性質の同定にも成功した。そして、基質と相互作用するアミノ酸や触媒活性を促進するアミノ酸を配置するための蛋白質を選定した後、金属錯体を化学的に修飾することで、非ヘム系人工金属酵素の創生を試みた。しかし、それら蛋白質におけるアミノ酸変異導入による基質分子認識と触媒機能を同時に発現させる最適配列を決定することは困難を極めた。

そこで、自然界の蛋白質の誕生と進化の過程を人工的に模倣した「試験管内分子選択進化システム」を独自に開発・応用することで、金属錯体形成・基質分子認識・触媒機能を同時に発現させる人工ペプチドを創出する新たなアプローチにより、目的を達成することにした。そのシステムとは「安定架橋型リボソームディスプレイ法」である(図1)。

この進化分子工学的手法は、人工ペプチドライブラリー(APL)から標的分子に対して特異的に結合する新規ペプチドのみを効率的かつ迅速に選択することが可能である。本システムの操作手順としては(図1)、まず、ペプチドライブラリーの配列情報をコードしているDNAをmRNAへと転写した後(図1-1)、ペプチドとそのmRNAをリボソームにより連結した「安定架橋型リボソーム複合体：対応付け分子(図1-2中央下)」を調整する。そして、標的分子に対して高親和性を示す特殊ペプチドを提示した複合体を選択した後(図1-3)、その複合体からmRNAを回収し(図1-4)、そのmRNAに記録されているアミノ酸配列を

解析することで(図1-5)、目的の標的分子に結合する新規ペプチドを同定することができる。特に、この「安定架橋型リボソーム複合体(図1-2中央下)」は、mRNAの5'端に導入したCv motifと結合するバクテリオファージ由来の蛋白質(Cvap)をペプチドライブラリーのC末端側に融合している。その結果、試験管内の翻訳反応と同時に、Cv motif-Cvap会合体が分子内で形成され、より熱的に安定な「対応付け分子」の構築と利用が可能となった。

図1. 「安定架橋型リボソームディスプレイ法」の操作サイクル



つまり、このシステムは、人工的に合成した膨大なペプチドライブラリーの中から、金属酵素活性中心に類似した機能を発現する人工ペプチドを短期間で選択・創生する画期的な進化分子工学的手法であり、これまでのX線結晶構造解析・コンピューターシミュレーションでは予測できなかった未知の特殊機能を創出することが可能となる。

## 4. 研究成果

現在までに、金属酵素の活性中心モデルとしての金属錯体の合成と電子的・立体的キャラクター化を皮切りに、本研究において開発した「安定架橋型リボソームディスプレイ法」を駆使して、金属酵素様の基質分子認識と触媒機能を発現する人工生体反応場としての人工ペプチドの新規選択に成功した。

一例としては、本システムを利用して、金属-カルボキシレート錯体(標的分子)に対して特異的に結合する環状型人工ペプチドの選択を行った。その結果、選択された新規ペプチドは、自然界に存在する金属酵素の活性中心構造に必須のアミノ酸群を豊富に有するだけでなく、標的分子の金属錯体に対して特異的親和性を示すことを明らかにした。また、遊離のCo(II)イオンやZn(II)イオンと結合する金属結合サイトを複数有する人工ペプチドが、リボ核酸のリン酸エステル部位

を触媒的に加水分解する「リボヌクレアーゼ活性」を発現することを見出した。特に興味深いのは、このリボヌクレアーゼ反応(37°C・pH 7.5)が、ペプチドのアミノ酸配列と環状構造に依存した現象であると共に、その反応活性は、金属イオンの種類や pH 等の反応条件に依存して変化する点である。

今回の金属-カルボキシレート錯体に結合する人工ペプチドが、リボヌクレアーゼ活性を発現した理由としては、ペプチドが形成する「アコイオン-金属イオン-カルボキシレート-ペプチド骨格」の立体構造が、金属酵素リボヌクレアーゼが利用するリン酸エステル部位の認識と分解反応の開始に必要な中間体構造「ヒドロキソイオン-金属イオン-フォスフェート-蛋白質骨格」に類似していることが推測される。

以上の結果は、本研究で開発した進化分子工学的手法が、金属酵素ミメティック・生体金属触媒を創生する手段として有用であることを示している。そして現在も、目的の生化学反応を促進する人工金属酵素のテーラード創生を実現する画期的バイオテクノロジーシステムとして確立すべく取り組んでいる。また、本研究で得られた成果は、国内外の学会・研究会・国際会議において口頭・ポスター発表等を行うと同時に、国際的に著名な科学系ジャーナルにおける論文として発表し、世界に先駆けて発信している。さらに、本研究で開発した新技術とそこから生み出された新物質を特許化する取り組みにまで至っている。

今後は、ここで得た知見と技術を最大限に活かし、人工配位子-tRNAを化学的に合成し、それらを導入した無細胞蛋白質翻訳系と「安定型リボソームディスプレイ法」を利用することで、金属錯体触媒を組み込んだ分子認識ペプチドを新規に選択する。そして、これまでにない人工金属ペプチド酵素として世界に先駆けて構築する。さらに、工業的物質生産の効率向上を支援する金属ペプチド触媒から、生体内で生理活性を発揮し、各種疾病の治療に役立つ金属ペプチド診断薬・機能性ペプチド医薬の開発にまで発展させることを将来の目標としている。

## 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 8 件)

Akira Wada and Yoshihiro Ito 「The Highly Stabilized Ribosome Display Selection of Metal Binding Peptide Aptamers」 *Nucleic Acids Symp. Ser.* (Oxf) 査読無し, 2009, in press.

Makoto Sakuragi, Saki Tsuzuki, Hirokazu Hasuda, Akira Wada, Kenji Matoba, Izumi Kubo, and Yoshihiro Ito 「Synthesis of a Photoimmobilizable Histidine Polymer for Surface Modification」 *J. Appl. Polym. Sci.* 査読有り, 2009, 112, 315-319.

Saki Tsuzuki, Akira Wada, and Yoshihiro Ito 「Photo-immobilization of Biological Components on Gold-coated Chips for Measurements using Surface Plasmon Resonance (SPR) and a Quartz Crystal Microbalance (QCM)」 *Biotechnol. Bioeng.* 査読有り, 2009, 102, 700-707.

Akira Wada, Shinya Y Sawata, and Yoshihiro Ito 「Ribosome Display Selection of a Metal-binding Motif from an Artificial Peptide Library」 *Biotechnol. Bioeng.* 査読有り, 2008, 101, 1102-1107.

Akira Wada and Yoshihiro Ito 「In vitro selection of artificial metal-binding peptides using cell-free display technology with combinatorial peptide libraries」 *J. Biol. Inorg. Chem.* 査読無し, 2007, 12, 156.

Takeshi Ishii, Akira Wada, Saki Tsuzuki, Mario Casolaro and Yoshihiro Ito 「Copolymers Including L-Histidine and Hydrophobic Moiety Preparation of Nonbiofouling Surface」 *Biomacromolecules* 査読有り, 2007, 8, 3340-3344.

Syuehei Yamaguchi, Teppei Takahashi, Akira Wada, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Koichiro Jitsukawa and Hideki Masuda 「Fixation of CO<sub>2</sub> Hydroxozinc(II) Complex with Pyridylamino Type Ligand」 *Chem. Lett.* 査読有り, 2007, 36, 842-843.

Yasutaka Honda, Hidekazu Arie, Takeshi Okumura, Akira Wada, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Koichiro Jitsukawa and Hideki Masuda 「Complexes with Fe<sup>III</sup><sub>2</sub>(μ-O)(μ-OH) Core Surrounded by Hydrogen-Bonding Interaction」 *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 査読有り, 2007, 80, 1288-1295.

[学会発表] (計 14 件)

<国際>

(1) Akira Wada 「Ribosome Display Selection of Target Binding Peptides from Artificial Peptide Library」 BIT Life Sciences' 2nd annual Protein and Peptide Conference & Exhibition (PepCon-2009), ソウル(韓国),

2009年4月

(2) Akira Wada and Yoshihiro Ito 「Ribosome display technology for selection of bio-functional peptides having metal-binding affinities」 The IUMRS (International Union of Materials Research Societies) International Conference in Asia 2008, 名古屋 (日本), 2008年12月

(3) Akira Wada and Yoshihiro Ito 「In vitro Selection of Artificial Metal-binding Peptides using Cell-free Display Technology with Combinatorial Peptide Libraries」 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, ウィーン (オーストリア), 2007年7月

<国内>

(4) 原 秀太・和田 章・栗田 公夫・伊藤 嘉浩 「リボソームディスプレイ法を利用した低分子化合物結合性ペプチドの新規選択と機能評価」 第58回高分子学会年次大会, 神戸国際会議場・国際展示場 (神戸), 2009年5月

(5) 阿部 祥子・和田 章・栗田 公夫・伊藤 嘉浩 「金属結合ペプチド融合蛋白質の創製と金属ナノ粒子への結合評価」 日本化学会 第89春季年会, 日本大学 (東京), 2009年3月

(6) 和田 章・伊藤 嘉浩 「機能性金属ペプチドの進化分子工学的設計と創製」 第57回高分子討論会, 大阪市立大学 (大阪), 2008年9月

(7) 和田 章・伊藤 嘉浩 「金属酵素機能を模倣する人工ペプチドの創製」 日本ケミカルバイオロジー研究会 第3回年会, 学術総合センター (東京), 2008年5月

(8) 和田 章・白井 晴奈・伊藤 嘉浩 「試験管内分子進化システムを利用した「金属ペプチド酵素」の人工創生」 日本化学会 第88春季年会, 立教大学 (東京), 2008年3月

(9) 和田 章・伊藤 嘉浩 「試験管内分子選択技術によるテイラーメイド・ペプチド創製システムの開発」 第4回ケミカルバイオロジーシンポジウム: 化学-生物融合領域創成の軌跡, 熱海 (静岡), 2008年2月

(10) 和田 章 「生物模倣と金属機能の利用によるコンビナトリアル・バイオテクノロジーの新展開」 第13回錯体化学若手の会 中部・

東海地区勉強会, 名古屋工業大学 (愛知), 2007年11月

(11) 和田 章・伊藤 嘉浩 「分子認識・自己集合機能を利用した人工生体超分子の構築とバイオ技術への応用」 第56回高分子討論会, 名古屋工業大学 (愛知), 2007年9月

(12) 和田 章・伊藤 嘉浩 「生体反応場の分子設計: 人工ペプチド-金属錯体の進化分子工学的創製」「分子系物性」研究会: 分子系の構造と電子状態 『生物物質科学』を目指して, 理化学研究所 (埼玉), 2007年4月

(13) 和田 章 「金属錯体の機能化による人工酵素分子の構築」 第2回バイオ医工学シンポジウム (理研シンポジウム): Synthetic Biologyの潮流-化学進化から生物進化、そして“バイオものづくり”へ、理化学研究所 (埼玉), 2007年3月

(14) 和田 章・澤田 慎矢・続 佐紀・伊藤 嘉浩 「機能性人工ペプチドを創出する試験管内分子選択システムの新規開発」 日本化学会 第87春季年会, 関西大学 (大阪), 2007年3月

〔図書〕 (計2件)

Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe, Akira Wada and Mingzhe Liu 「Design and Synthesis of Biorelated Polymers by Combinatorial Bioengineering」 *Polymer Biocatalysis and Biomaterials II*, In: H. N. Cheng and R. A. Gross eds., *American Chemical Society*, Washington, DC, 2008, Chapter 13. P194-215.

和田 章・阿部 洋・伊藤 嘉浩 「抗体医薬の最前線 - Frontier of Development of Antibody Medicine -」 シーエムシー出版 植田 充美 監修 (2007年) 応用編19章 アプタマー医薬 P213-225.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 新規ペプチドおよびその利用  
発明者: 和田 章・伊藤 嘉浩  
権利者: 独立行政法人理化学研究所  
種類: 基本特許  
番号: 特願 2008-290053  
出願年月日: 平成 20 年 11 月 12 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 亜鉛ヒドロペルオキシド錯体、過炭酸亜鉛錯体、および前記各化合物の酸化剤としての利用

発明者：増田 秀樹・実川 浩一郎・和田 章  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構  
種類：基本特許  
番号：特許第 3986448 号  
取得年月日：平成 19 年 7 月 20 日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 章 (WADA AKIRA)  
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：90443051