

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620131

研究課題名(和文)非天然型活性中心を導入したRNA-ペプチド複合体による協同的触媒機能の発現

研究課題名(英文)Toward a novel method for constructing an artificial ribonucleopeptide enzyme

研究代表者

森井 孝 (MORII, TAKASHI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：90222348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNAアプタマーにより形成した高い分子認識能を持つ基質結合部位と、ペプチドを導入した非天然の反応活性中心が協同的に作用するようにRNA-ペプチド複合体を形成させることにより、合成化学と進化学とを組み合わせた触媒機能を発揮する生体高分子の設計原理を開拓することを目的とした。申請者らが開発したATP結合性RNPをもとにしたRNP酵素を構築するために、活性中心を導入したペプチドライブラリーを合成し、ATP結合性RNAとの複合体形成によりRNPライブラリーを構築した。エステル加水分解活性を指標としたRNPライブラリーのスクリーニングを行った結果、加水分解反応を加速させるRNPが存在した。

研究成果の概要(英文)：A novel method for constructing an artificial enzyme by modification of the peptide subunit of ribonucleopeptide (RNP) with a catalytic group was investigated. We have developed a method to construct highly selective receptors for small molecules by using the RNP scaffold. The peptide subunit of RNP can be further functionalized with retaining the original molecular recognition of RNP receptor, for example, modification of the peptide with a fluorophore converts an RNP receptor to a fluorescent RNP sensor. In this study, an RNP library for the screening of catalytic activity was constructed by using an ATP-binding RNA library and a library of peptides modified at the N-terminal with a catalytic group through various kinds of peptide linkers. Screening of the RNP library for a hydrolytic activity afforded RNPs with enhanced activity.

研究分野：生物機能化学

キーワード：人工酵素 RNAアプタマー RNA-ペプチド複合体 ライブラリー 活性スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

人工的に酵素を作製する試みは、1970年代からシクロデキストリンなどの合成基質結合場に反応活性点を導入する方法論を基軸として展開されてきた。その後、進化工学手法により人工的に酵素を作製する試みがなされ、抗体触媒法では、遷移状態アナログへの結合を指標とした触媒の作製が主流である。RNA 酵素についても、遷移状態アナログへの結合、もしくは、酵素活性を指標とした SELEX (インビトロセクション) 法により、リン酸ジエステル結合形成・加水分解、ペプチジルリン酸結合、Diels-Alder 反応等の触媒が得られている。いずれも天然のアミノ酸、ヌクレオチドにより形成された活性中心を持つ酵素の作製に限られており、天然を凌駕する酵素の作製原理は確立されていない。

合成基質結合場には、天然には存在しない高い活性を有する触媒基を導入することが可能であるが、その分子認識能は、生体高分子と比べると満足できるものではない。一方、生体高分子で作製した基質結合場は、高い分子認識能と柔軟な構造を持つ。生体高分子で構築した基質結合場 (受容体) に人工的な活性中心を導入すると、理想的な人工酵素となると考えられるが、合成基質結合場を用いる場合と同様に、「結合場と活性中心が協同的に基質と作用する環境をいかにして構築するか」が、人工的に酵素を作製するための鍵となる。この問題を打破するためには、化学修飾を施した生体高分子に進化工学手法を適用して構造を最適化する必要があるが、抗体触媒法、RNA 酵素法ともにこの目的には適していない。

極めて高い情報認識・酵素機能を持つリボソームの三次元構造が明らかにされたことにより、RNA-タンパク質複合体の機能にも注目が集まっている。申請者らはこれまでに、①安定な Rev ペプチド-RRE RNA 複合体 (図 1 左下) の RNA に SELEX 法を適用することにより、ATP (*J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617 など)、特定の amino 配列中のリン酸化チロシン (*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8804)、そしてドーパミン (*Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4473) に対する基質結合部位を RNP により構築 (図 1 左上) し、② Rev ペプチドをライブラリー化することにより、段階的に RNP の分子認識能を向上 (図 1 右上: *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 30) させ、③ Rev ペプチドに蛍光分子を導入することで、さまざまな励起・発光波長、濃度領域で応答する蛍光 RNP センサーを構築 (図 1 右下: *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12932) した。

通常、RNP リセプターは、特定の基質に対して同一のコンセンサス配列を有する一群として得られる。即ち、RNA 中の認識部位がペプチドの N 末端に対してさまざまな位置に存在する「RNP リセプター群」(絞り込ま

れたライブラリー) として得られるのが特徴である。この「絞り込まれたライブラリー」を利用することで、RNP の段階的機能化が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、RNA-ペプチド複合体 (RNP) のペプチドサブユニットに天然には存在しない「反応モジュール」を導入し、RNA が形成する高度な分子認識場と非天然型の反応活性点が協同して作用する RNP 酵素の作製を試みる。RNA で作製した分子認識場の近傍に活性点を導入するだけでは、効率的な触媒機能は期待できない。そこで、複合体 RNP の利点を活かした段階的な進化工学手法を開発して、ペプチドに導入した活性基が RNA 基質結合場に対して適切に配置された RNP 酵素の創製に挑戦する。

3. 研究の方法

基質結合場に存在する基質に対して、触媒機能を発揮するうえで理想的な位置に反応活性点を配置するために、①あらかじめ RNA で形成した分子認識場群を用いて、ペプチドに補因子を導入した分子認識面と協同的に基質結合場を形成する RNP リセプターを選出する方法を確立する。その方法を応用して、②あらかじめ RNA で形成した分子認識場群を用いて、ペプチドに導入した反応モジュールが協同的に作用する RNP 酵素を選出する段階的な方法論を開拓する。それに加えて、触媒活性を指標とした進化工学手法も試み、③ペプチドに導入した反応モジュールが活性を発揮する RNP 酵素を SELEX 法により選出する。これらの方法を通じて『非天然型活性中心をもつ RNP 酵素』を創製する原理を確立する。

4. 研究成果

本研究は RNA により形成した高い分子認識能を持つ基質結合部位と、ペプチドに導入した非天然の反応活性中心が協同的に作用するように RNA-ペプチド複合体構造を最適化することにより、「非天然型活性中心を導入した RNA-ペプチド複合体による協同的触媒機能の発現」を実証し、合成化学と進化工学とを組み合わせた触媒機能を発揮する生体高分子の設計原理を開拓する。現在までに以下の研究を行った。

申請者らが開発した ATP 結合性 RNP は、その RNA 中で U:A:U トリプレットを形成してアデノシン (Ado) 部位を認識するが、ピロリン酸部位は認識しない。この分子認識の特長を活かして、ATP 結合性 RNP のペプチドサブユニットに反応モジュールを導入した RNP 酵素を構築するために、以下の方法論を検証した。

(1) 活性中心を導入したペプチドライブラリーの合成: Ado 認識様式が明らかな RNA 群と分子認識因子を導入した Rev ペプチドを利用した。加水分解反応の活性点ジメチルアミノピリジン (DMAP) を種々のリンカーを介し

てN末端に導入したRevペプチド誘導体を合成し、それらとAdo結合性RNAサブユニット群とをRRE RNA配列を介してRNP複合体を形成させて、Adoに結合するRNPライブラリーを形成した。

(2) 活性を指標としたライブラリースクリーニング：(1)で構築したRNPライブラリーを用いて、アデノシン骨格を有するパラニトロフェノールエステルの加水分解能を指標にして、ライブラリーを構成するRNPのエステル加水分解能を評価した。RNPを用いた酵素作製法が実現可能かどうかを調べるため、ATP結合性RNPリセプターのペプチドに、非天然型活性中心としてエステルへの求核攻撃により加水分解を促進するDMAPを導入したRNPを作製し、加水分解活性を評価した。基質として、分光学的に加水分解反応の評価が容易なp-ニトロフェニルエステルを含むアデノシン誘導体を用い、このRNPの触媒活性を評価した。その結果、DMAP単独よりも、DMAP修飾RNPの方が反応を加速させるRNPが存在した。

(3) 金属配位子活性中心を導入したペプチドライブラリーの合成：2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール亜鉛(II)錯体をN末端に導入したRevペプチド誘導体を合成した。引き続き(1)と同様に様々なリンカーを介したペプチドライブラリーを構築し、(2)と同様に活性を評価する。(2)で得られたRNPをもとにしてRNAとペプチドリンカーのライブラリーを作製することで、さらに加水分解活性の高いRNP酵素が得られれば、本研究で検討したRNP酵素作製法は、一般的酵素作製法となる。

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 6件)

Kiyonaka, S., Kajimoto, T., Sakaguchi, R., Shinmi, D., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Imamura, H., Yoshizaki, T., Hamachi, I., Morii, T., Mori, Y.

Genetically encoded fluorescent thermo-sensors for visualizing subcellular thermoregulation in living cells.

Nat. Methods

10, 1232-1238 (2013)

doi: 10.1038/nmeth.2690

Carrette, Lieselot L. G.; Morii, Takashi; Madder, Annemieke

Toxicity inspired cross-linking for probing DNA-peptide interactions

Bioconjugate Chemistry

24 (12), 2008-2014 (2013)

doi: 10.1021/bc400327q

Ngo, Tien Anh; Nakata, Eiji; Saimura, Masayuki; Kodaki, Tsutomu; Morii, Takashi
A protein adaptor to locate a functional protein dimer on molecular switchboard.

Methods

2013 in press

doi: 10.1016/j.ymeth.2013.10.014

Carrette, Lieselot L. G.; Morii, Takashi; Madder, Annemieke

Peptidosteroid Tweezers Revisited: DNA Binding Through an Optimised Design.

Eur. J. Org. Chem.

2014 (14), 2883-2891 (2014)

doi: 10.1002/ejoc.201301854

M. Inoue, S. Kaida, S. Nakano, C. Annoni, E. Nakata, T. Konno, T. Morii

Phosphorylation regulates fibrillation of an aggregation core peptide in the second repeat of microtubule-binding domain of human tau

Bioorg. Med. Chem

22, 6471-6480 (2014)

doi:10.1016/j.bmc.2014.09.032

E. Nakata, H. Dinh, T.A. Ngo, M. Saimura, T. Morii

A modular zinc finger adaptor accelerates the covalent linkage of proteins at specific locations on DNA nanoscaffolds

Chem. Commun.

51, 1016-1019 (2015)

doi: 10.1039/c4cc08167f

[学会発表] (計 12件)

森井 孝

Construction of Protein Assemblies on Molecular Switchboard

A3RONA2013

2013.8.31

Konan University

招待講演

森井 孝

DNA ナノ構造体による機能性タンパク質組織体の構築

高分子討論会

2013.9.12

金沢大学

仲野 瞬、劉 芳芳、田村友樹、中田栄司、森井 孝

共有結合化蛍光性RNPセンサーの同時利用
第7回バイオ関連シンポジウム

2013.9.27

名古屋大学

田村友樹、仲野 瞬、吉村祐輝、中田栄司、

森井 孝
反応活性中心を導入したリボヌクレオペプチドの触媒活性
日本化学会第 94 春季年会
2014. 3. 29
名古屋大学 東山キャンパス

森井 孝
Spatially organized assembly of enzymes and receptors on the molecular switchboard
Cutting-edge Technologies for New Drug Discovery and Development
2015. 2. 5
Dongguk University
招待講演

森井 孝
Spatially organized assembly of enzymes on the molecular switchboard
Special Faculty Seminar
2015. 2. 3
College of Pharmacy, Ewha University, Korea
招待講演

田村友樹, 有山健太, 仲野瞬, 森井孝
非天然活性中心を導入したリボヌクレオペプチドの触媒活性
第 8 回バイオ関連化学シンポジウム
2014. 9. 11
岡山

仲野瞬, 森井孝
ピロリン酸部位の識別が可能な ATP センサーの作製と機能評価
第 8 回バイオ関連化学シンポジウム
2014. 9. 11
岡山

S. Nakano, T. Morii
Construction of ATP sensor with high specificity for the pyrophosphate moiety
ISNAC2014 第 41 回国際核酸化学シンポジウム
2014. 11. 5
福岡

T. Tamura, K. Ariyama, S. Nakano, T. Morii
Ribonucleopeptides with catalytic functional groups
ISNAC2014 第 41 回国際核酸化学シンポジウム
2014. 11. 5
福岡

仲野 瞬・田村 友樹・森井 孝
ATP のピロリン酸部位を識別する蛍光性センサーの作製
日本化学会第 95 春季年会
2015. 3. 26-29

千葉
仲野 瞬・田村 友樹・森井 孝
ATP のピロリン酸部位を識別する蛍光性センサーの作製
日本化学会第 95 春季年会
2015. 3. 26-29
千葉

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
研究室ホームページ :
http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12_j.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
森井 孝 (TAKASHI MORII)

研究者番号 : 90222348

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :