

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810090

研究課題名(和文) タンパク質リン酸化反応を触媒する人工酵素の作製

研究課題名(英文) Construction of artificial enzyme for the phosphorylation of proteins

研究代表者

仲野 瞬 (Nakano, Shun)

京都大学・エネルギー理工学研究所・助教

研究者番号：40650809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-ペプチド複合体(RNP)を構造基盤に用いて、各サブユニットを同時にライブラリー化した「RNP複合ライブラリー」作製し、進化工学手法によりペプチドのリン酸化反応を触媒する人工酵素の獲得を目指した。効率的な翻訳反応とペプチドサブユニットとの複合体形成が可能なmRNA配列の設計とライブラリー合成条件を検討した。また、ATPのリン酸基を識別できるRNPリセプターの分子選択条件を検討し、新規のリセプターを獲得した。さらに、RNPリセプターの修飾法を検討し、人工酵素をはじめとする機能性RNPのスクリーニングを行うためのライブラリー作製条件を新たに開発した。

研究成果の概要(英文)：The method for the construction of “covalently-linked RNA-peptide complex library” that has the randomized region both in RNA and peptide subunit was developed to perform the screening of the artificial RNP enzymes for the post-translational phosphorylation of targeted peptide and protein. We could establish the conditions to synthesize the RNP library by applying the mRNA display method. In addition, we could find the screening conditions for the construction of ATP-binding RNP receptors with high specificity for the pyrophosphate moiety of ATP through the verification of the effect of the conditions of the counter-SELEX to the specificity of receptors. Furthermore, we developed the post-modification method of the RNP receptors for the screening of the functional RNPs that are modified with fluorophores or catalytic groups. These results can be utilized for the rational screening of the artificial enzymes from the new RNP library.

研究分野：生物有機化学

キーワード：リボヌクレオペプチド 人工酵素 リン酸化 in vitro セレクション リセプター

1. 研究開始当初の背景

細胞内においてタンパク質は翻訳後にグリコシル化、リン酸化、アセチル化など様々な化学修飾を受け、フォールディングが変化して成熟した構造を形成し活性化される。翻訳後修飾はタンパク質の輸送、局在化、分解や、他分子との相互作用変化による細胞内シグナルの変化、遺伝子発現の調節など、幅広い細胞内生体高分子の動態の制御に関与している。このような翻訳後修飾の生理的な役割の解明は、生理現象の解明に重要である。

翻訳後修飾がなされたタンパク質を獲得するためには、細胞内で修飾されたタンパク質を特異的に回収するか、目的の修飾箇所に応じた天然酵素を用いてタンパク質発現後に修飾を行うなどの技術が必要である。しかし、従来の方法では標的とする特定の修飾を受けたタンパク質の収量の低さや修飾の多様性による精製の困難さなど課題が多い。例えば、目的とする翻訳後のタンパク質の修飾が可能な酵素が同定されている場合は、タンパク質発現後に酵素反応的に修飾を行うことができるが、必ずしも目的の部位に修飾を行う酵素が同定できているわけではなく、また天然酵素反応では複数のサイトが同時に反応を受ける場合もあるため、ある特定の部位のみを修飾したい場合には、別の方法を検討する必要がある。

これらの問題に対して、①多様な目的基質部位に対して人工酵素を効率的に作製できる方法を確立し、②人工酵素の利用によりタンパク質の特定箇所に特異性の高い化学修飾を行うことができれば、人工的なタンパク質の発現後修飾を行うための利便性の高い技術となる。そのためには、ライブラリー法を用いた新たな人工酵素作製法の確立が有用である。タンパク質の発現後に特定の部位に目的の化学修飾を行うことができる人工酵素の開発において、ライブラリーに用いる分子には、①高い基質配列特異性を実現できる ②化学反応性の多様さをもつ ③様々な基質配列に対する酵素を簡便にスクリーニングできるという点が要求される。①の特定のアミノ酸配列の認識について、我々はこれまでに特定のアミノ酸配列を認識する RNA-ペプチド複合体 (RNP) リセプターの作製に成功している (Hasegawa, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8804)。このリセプターは核酸が主な基質認識場となっている。②については、これまでに核酸ライブラリーを用いた人工酵素作製事例として、リン酸ジエステル結合形成・加水分解反応、Diels-Alder 反応等を触媒する人工酵素の作製などが行われている (Gold, L. *et al. Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763 など)。これらの事例から見て、リン酸化や糖鎖付加反応などを行える化学反応性のキャパシティを核酸は有していると考えられるが、過去にタンパク質の翻訳後修飾を行うリボザイムの作製事例はなく、これらの反応が実際に可能であるかどうかは明確でない。従来このような酵素が獲得されてこ

なかった理由として、まず我々が扱える分子のサイズが天然酵素に比べて小さいこと、あるいは核酸の分子多様性がより高度な化学反応を触媒するには不十分である可能性があることが考えられる。そこで、核酸ライブラリーだけではなく、化学的多様性の高いペプチドライブラリーを同時に組み合わせることにより、化学構造が多様な場の構築を実現することで、触媒活性を持つ分子の獲得効率を向上できないかと考えた。この戦略の実現には、我々がこれまでに開発してきた「RNA-ペプチド複合体を構造基盤とした機能性分子作製法」が有用である。

2. 研究の目的

翻訳後のタンパク質の特異的な化学修飾を行うため、標的となる多様なペプチド(タンパク質)基質部位に対して人工酵素を効率的に作製できる方法を確立し、その人工酵素の利用によりタンパク質の特定箇所に特異性の高い化学修飾を行うことができれば、非常に利便性の高い技術となる。

本研究では、ライブラリー法を用いて *in vitro* でタンパク質の翻訳後修飾が可能な人工酵素の作製を目指す。RNA-ペプチド複合体 (RNP) を構造基盤に用いて、mRNA ディスプレイ法を応用したライブラリー合成をおこなうことにより、RNA とペプチドを同時にライブラリー化した「RNA-ペプチド複合ライブラリー」の作製方法を確立する。続いて、触媒活性を指標とした分子選択方法により、特定のアミノ酸配列に対する修飾反応を触媒する人工酵素を獲得する方法論の確立を行い、実際のタンパク質の化学修飾法としての応用を目指す。タンパク質の翻訳後修飾に関連する化学反応の一つであり、細胞内シグナル伝達に関与して非常に多くのタンパク質で観られる「リン酸化」を標的反応とする。

3. 研究の方法

タンパク質の発現後に特定の部位に目的の化学修飾を行うことができる人工酵素の開発において、ライブラリーに用いる分子には、①高い基質配列特異性を実現できる ②化学反応性の多様さをもつ ③様々な基質配列に対する酵素を簡便にスクリーニングできるという点が要求される。

これまでに申請者らが開発した RNA-ペプチド複合体(RNP) を構造基盤に用いたリセプター作製方法論では、RNA サブユニットに構築した基質結合場をペプチドサブユニットを用いてさらに拡張し、基質認識能を改善することに成功している。このように複数のライブラリーを組み合わせることで、複数の機能ユニットが協同的に機能を発揮することにより、単一の分子より優れた特性を示す分子が作製できる可能性がある。

したがって本研究では、核酸-ペプチドを同時にランダム化した「複合ライブラリー」を用いて、特定のアミノ酸配列に対する翻訳後修飾を触媒

する人工酵素の獲得を行う。mRNA ディスプレイ法を応用して、RNA サブユニットがペプチドサブユニットのアミノ酸配列をコードした分子の設計を行い、無細胞翻訳系を用いて翻訳後に RNA とペプチドサブユニットが共有結合的に連結されたライブラリーを作製する。ランダム部位に隣接して導入した複合体形成部位の複合体形成に伴って、RNA、ペプチドそれぞれのランダム部位が空間的に近接する。ペプチドサブユニット配列は RNA サブユニットがコードしており、スクリーニング後の配列解析は従来の塩基配列解析方法をそのまま適用できる。

この RNA-ペプチド複合ライブラリーを用いて、標的ペプチドのアミノ酸配列特異的なリン酸化触媒活性を指標としたセレクションを行い、タンパク質翻訳後修飾を可能とする人工 RNP 酵素の作製を行う。ペプチドサブユニット末端に、標的となる基質ペプチド配列を既定配列として導入する。リン酸化されたペプチドを固相上のリン酸タグによって回収することで、ペプチドリソ酸化活性を有する RNP の獲得を行う。

4. 研究成果

本研究では、RNA-ペプチド複合体(RNP) を構造基盤に用いたタンパク質の翻訳後修飾反応を触媒する人工酵素作製方法論の確立に向けて、以下の項目について検討した。

(1) RNA - ペプチド複合ライブラリー作製条件の検討： 従来、ペプチドライブラリーを合成する方法として開発・利用されてきた mRNA ディスプレイ法では、無細胞翻訳系を用いた翻訳後に、ランダム化された RNA がペプチドライブラリーの各アミノ酸配列をコードし、かつ RNA とペプチドが共有結合的に連結される。この際、一般的に RNA 部分は、ランダム化されたペプチド部に影響を与えないよう逆転写反応によって RNA-DNA 二重鎖を形成させ不活化する。本研究では、この技術を応用して翻訳後の RNA が一本鎖の状態を維持し、かつ合成後に RNA サブユニットとペプチドサブユニットが定常領域(複合体形成領域)で安定に複合体形成する「RNA - ペプチド複合ライブラリー」(RNP 複合ライブラリー)の作製を行った。

この RNP 複合ライブラリーを収率よく合成する条件を確立するため、RNA の複合体形成領域の配列設計、設計した RNA 配列のペプチドとの複合体形成能の確認、高い収率、純度での RNA 調製条件の検討、そして無細胞翻訳系によるペプチドサブユニットの合成条件について検討を行った。ペプチドサブユニットの複合体形成部位の一部をコードするように設計した RNA は、期待通り複合体形成能を有し、蛍光分子を修飾したペプチドサブユニットとの複合体形成によって ATP 結合性蛍光性 RNP センサーを作製することができた。また、RNA ライブラリーの

調製条件、ペプチドサブユニットライブラリー合成の条件検討によって、複数の異なる分子種のライブラリーが複合体形成によって空間的にそのランダム領域を近接させる「RNA - ペプチド複合ライブラリー」合成の基本条件の確立に成功した。

(2) ピロリン酸部位を特異的に認識する ATP 結合性 RNP リセプター、蛍光性センサーの作製： リン酸化反応において、リン酸基の識別は重要な要素の一つである。従来の核酸ライブラリーを利用したセレクションでは、リン酸基のようなアニオン性の部分構造を識別するのが比較的難しいと考えられてきた。本研究で作製した「RNP 複合ライブラリー」と、核酸サブユニットをランダム領域とする既存の「RNP ライブラリー」との間での、リン酸基部位を認識するリセプター作製における相違について検討することは、新たに作製した複合ライブラリーの有用性や、ペプチドサブユニットの、分子認識ならびに化学反応場構築に対する寄与を考察する上で重要である。そこで、ATP 結合性 RNP リセプターを事例として、ATP のピロリン酸部位を特異的に識別可能な RNP リセプターのセレクション条件について検討を行った。既存の RNP ライブラリーを用いて、ADP に対する非結合画分から、ATP に対する結合画分を回収する条件を適用して *in vitro* セレクションを行った。その結果、ATP のピロリン酸部位を特異的に識別可能な RNP リセプターの作製に成功した。このリセプターはこれまでに報告されている ATP 誘導体に関するアプターとは異なる新規の塩基配列を有しており、基質 ATP の塩基部位、ピロリン酸部位ともに識別可能であることが明らかになった。また、このリン酸基識別型 ATP 結合性 RNP リセプターはペプチドサブユニットに対する様々な蛍光分子の導入により、蛍光性 ATP センサーへの機能改変も従来通り可能であった。一方で、その基質親和性は従来のリセプターよりも低く、また結合種の配列の多様性も限定されていた。このように、核酸部分を主とする RNP ライブラリーを利用した場合には、リン酸基部分を識別するリセプターの獲得は比較的難しいことが示された。基質選択性と親和性を両立した RNP リセプターを獲得するには、セレクション条件、分子選択圧をさらに最適化していく必要性があると考えられる。

リン酸化部位の認識は、リン酸化酵素の化学反応特異性と密接に関係しており、この知見によって人工酵素セレクション時の分子選択条件の決定や、RNA 単独のライブラリーと RNA-ペプチド複合ライブラリーそれぞれから選択された分子の特性差を比較することが可能になる。今後、作製した RNP 複合ライブラリーを用いて、同様のセレクション条件を適用してリセプターを獲得し、ペプチドサブユニットのライブラリーがリン

酸基認識にどのように寄与するかを機能解析、構造解析を通じて検討することで、本ライブラリーの分子認識場構築に対する有用性、特徴を明らかにしていく予定である。

(3) RNP リセプターの合成後化学修飾法の開発：有機触媒や金属錯体等の触媒活性中心を導入することにより、ペプチドサブユニットに化学反応場の構築が可能となるよう、ライブラリー合成後のペプチドサブユニットの化学修飾方法の検討を行った。

ペプチドサブユニット N 末端に導入した Cys 残基を介して、蛍光分子のライブラリーを、ペプチド合成後に修飾する条件を確立した。また、合成した蛍光分子修飾 RNP ライブラリーを用いて、蛍光強度変化を指標とした RNP センサースクリーニングの方法論開発へとこの手法を発展させた。現在、第一段階スクリーニングにより得られた高い蛍光強度変化を示すセンサー群について、より正確な機能評価を行う第二段階目のスクリーニングを行っている。

(4) 結合場が N 末端に近接した RNP リセプターの選択方法の検討：申請者がこれまでに開発した ATP のアデノシン部分を主に認識する ATP-結合性 RNP リセプターを利用して、基質-ペプチドサブユニット N 末端間が近接した分子を FRET を用いて分光学的に選択する方法および条件について検討した。

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)

[学会発表] (計 8 件)

① 蛍光分子ライブラリーを利用したリボヌクレオペプチドセンサーのスクリーニング, 仲野瞬、田村友樹、Chang Young-Tae, 森井孝, 日本化学会第 96 春季年会 (2016), 2015 年 03 月 26 日～2015 年 03 月 29 日, 同志社大学京田辺キャンパス

② リボヌクレオペプチドによるエステル加水分解, 田村友樹、有山健太、仲野瞬、森井孝, 日本化学会第 96 春季年会 (2016), 2015 年 03 月 26 日～2015 年 03 月 29 日, 同志社大学京田辺キャンパス

③ 金属イオン錯体を導入したリボヌクレオペプチドによるエステル加水分解, 有山健太、田村友樹、仲野瞬、森井孝, 日本化学会第 96 春季年会 (2016), 2015 年 03 月

26 日～2015 年 03 月 29 日, 同志社大学京田辺キャンパス

④ Specific detection of ATP by fluorescent ribonucleopeptide sensors, Shun Nakano, Tomoki Tamura, Takashi Morii, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 15 日～2015 年 12 月 20 日, Honolulu, Hawaii

⑤ Construction and screening of the RNP library with catalytic functional group, Tomoki Tamura, Kenta Ariyama, Shun Nakano, Takashi Morii, Pacificchem2015, 2015 年 12 月 15 日～2015 年 12 月 20 日, Honolulu, Hawaii

⑥ ATP のピロリン酸部位を識別する蛍光性センサーの作製, 仲野瞬、田村友樹、森井孝, 日本化学会第 95 春季年会 (2015), 2015 年 03 月 26 日～2015 年 03 月 29 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス/薬学部

⑦ Construction of ATP sensor with high specificity for the pyrophosphate moiety, Shun Nakano, Takashi Morii, 第 41 回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2014), 2014 年 11 月 05 日～2014 年 11 月 07 日, 北九州国際会議場

⑧ 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, 仲野瞬、森井孝, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 2014 年 09 月 11 日～2014 年 09 月 13 日, 岡山大学 津島キャンパス

[その他]

ホームページ等

生物機能化学分野 森井研究室

www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲野 瞬 (NAKANO, Shun)

京都大学エネルギー理工学研究所 助教
研究者番号：40650809

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：