

研究課題別評価

1. 研究課題名 複数のサブユニットから成るテラーメイド人工酵素の創製

2. 研究者氏名 森井 孝

3. 研究の狙い：

生体内での化学反応を制御し、環境に優しい化学反応を行う酵素を人工的に作ることが出来れば、産業的にも医学的にも大きな意味を持つ。有機合成化学によって多段階的に機能性分子を合成するように、タンパク質や RNA をもとにした組織体を段階的に機能化することによって、望みとする基質選択性、化学反応性を持つテラーメイド酵素を作製することはできないか、という考えが本研究の発端である。段階的に機能性組織体を構築するための土台として、二つの生体高分子サブユニットを組み合わせた機能性スモールドメインを作製した。それぞれのサブユニットにライブラリー法を適用し、目的の基質に最適な分子認識場、化学反応場を段階的に設計し、任意の基質に対する人工酵素を設計するための新しい方法論を開発するとともに、ポストゲノム科学において重要と考えられる、生体内シグナル伝達の検出、制御が可能な機能性素子を創製することを目指した。

4. 研究結果：

合目的なテラーメイド酵素作製法を確立するためには、二つのサブユニットからなる組織体を、段階的に機能化する方法論を確立する必要がある。さきがけ研究では、まず、RNA とペプチドのふたつのサブユニットから形成される生体高分子スモールドメインをもとにして、それぞれのサブユニットを段階的に機能化し、テラーメイドリセプターを構築する方法論の開発を行った。即ち、段階的に機能化する方法論を確立した後、テラーメイド・リセプターを土台としてテラーメイド酵素を作製する、という戦略である。

4.1 テラーメイドリセプターを作製する方法の開発

段階的機能化法の第一段階として、RNA サブユニットを機能化することにより、テラーメイドリセプターを作製する方法を開発した。既知の RNA とペプチド複合体の三次元構造 (Rev - RRE) をもとにして、二つのサブユニットからなる生体高分子組織体を設計した。標的分子との結合ポケットを作製するための 20 もしくは 30 塩基ランダム塩基配列部位 (約 $10^{12} \sim 10^{18}$ 種類) とペプチド結合部を持つ RNA サブユニットおよび、RNA サブユニットと特異的に結合するペプチドサブユニットを合成し、それらの複合体リボヌクレオペプチド (RNP) ライブラリーから標的分子アデノシン三リン酸 (ATP) と結合するリボヌクレオペプチドを得た。20 塩基の RNA ランダム塩基領域をもとにした ATP 結合性 RNP リセプターは、16 μM の解離定数で ATP に結合し、ATP と他のヌクレオチド三リン酸 (CTP、GTP および UTP) を識別した。30 塩基の RNA ライブラリーを用いた場合には ATP リセプターとして機能するコンセンサス配列は 20 塩基の場合と同じであったが、得られたリボヌクレオチドリセプターの ATP に対する親和性は増大した。また、RNA サブユニットライブラリーから作製したリボヌクレオペプチド・ライブラリーをもとにして、リン酸化チロシンおよびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) に結合するリボヌクレオペプチド・リセプターを作製することに成功した。

4.2 ATP 結合性 RNP リセプターの第二段階機能化

ATP 結合性 RNP リセプターの第二段階機能化は、ファージディスプレイ法を用いてペプチドサブユニットをライブラリー化することにより行った。ペプチドサブユニットの N 末端に 7 アミノ酸からなるランダムなアミノ酸配列を付加したペプチドライブラリー (約 10^9 種類) をファージディスプレイ法により作成し、ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと複合体を形成することにより、RNP ライブラリーを作製した。この RNP ライブラリーから、ATP と CTP、UTP、GTP が識別できるだけでなく dATP には結合しない、即ち、アデノシン三リン酸の糖部が識別可能なリボヌクレオペプチドリセプターを得た。

これらの結果から、ペプチドサブユニットをライブラリー化する方法論を用いて、まず(1)ATP 塩基部分を認識する結合ポケットを作製し、次に(2)ATP のリボース部分を認識するポケットを作製する、という RNA-ペプチド複合体リセプターの段階的分子認識機能進化が可能であることが実証できた。

4.3 RNP リセプターを用いたセンサーの開発

RNP リセプターは RNA とペプチドのサブユニットから形成されるため、ペプチドサブユニットを容易に化学修飾することができる。この特長を生かして、リボヌクレオペプチドリセプターのペプチドサブユニットを、蛍光分子を付加したペプチドサブユニットに変換することにより、非常に簡単にリセプターからセンサーへと機能変換する方法論を開発した。

4.4 タンパク質をもとにした二つのサブユニットからなる機能性組織体

RNA とペプチドの二つのサブユニットからなる複合体をもとにして、段階的機能化法を用いることにより、テラーメイドリセプターが作製できることが明らかになったが、同様の手法は、タンパク質をもとにした二つのサブユニットからなる機能性組織体についても適用できると考えられる。さきがけ研究では天然のタンパク質複合体を用いるのではなく、天然のタンパク質ドメインをふたつに分割したのち、再構築することによって、二つのサブユニットからなるタンパク質ドメインを作製した。

PH ドメインは約 120 アミノ酸からなる安定なタンパク質であり、イノシトール三リン酸に対して高い親和性を持っている。本研究では PH ドメインを二つのサブユニットに分割し、それぞれにコイルドコイルを付加することによって、再構築を可能にした。再構築したスプリット PH ドメインはイノシトール三リン酸 (IP_3) に対して強く結合し、かつ $L-IP_3$ とは結合しないというもとの PH ドメインと同様の特性を示すことから、機能再構築が可能であることが実証された。

4.5 PH ドメインを用いた蛍光センサー

スプリット PH ドメインの土台として用いた PH ドメインタンパク質は、イノシトール三リン酸 (IP_3) と選択的に結合することが知られている。コンピューター・ケミストリーにより、PH ドメイン中の IP_3 結合領域周辺での蛍光分子導入可能な位置を探索し、蛍光分子導入のためのシステインへのアミノ酸変異 PH ドメイン作製、蛍光分子による化学修飾、そして機能評価という過程を経て、天然のタンパク質を蛍光センサーへと変換することに成功した。水溶液中で使用可能な IP_3 センサーとしては、初めての例であり、本研究成果は Science 誌の Editors' Choice (2002, 295, 931) でも紹介さ

れた。結合ポケットに蛍光分子を内包させて準安定状態を形成させることにより標的分子 IP_3 への選択性を向上させる、という概念のもとに分子設計を行い、天然の PH ドメインよりも高い IP_3 選択性を示す光学的 IP_3 センサーが得られた。

IP_3 センサーに細胞導入ペプチド 9 つのアルギニン配列) を付加することにより、細胞内で IP_3 を可視・定量化できることが明らかになり、刺激に応じて細胞内カルシウム濃度と連動した細胞内 IP_3 濃度変化を検出することが出来た。

5. 自己評価：

5.1 テーラーメイドリセプターを作製する方法の開発

既に、Szostak らが 120 塩基からなるランダム RNA 配列を用いて、RNA 分子のみからなる ATP リセプターを作製しているが、120 塩基ランダム RNA 配列は約 10^{72} 種類もの組み合わせがあるため、すべての分子種を含んだライブラリーを作製できないことが実用上の問題であった。本研究では、安定な三次元構造を保持するために RNA-ペプチド複合体をもとにして、RNA サブユニットのうちわずか 20 塩基をライブラリー化することで、RNA サブユニットとペプチドサブユニットからなる ATP を認識する組織体を作製することに初めて成功した。

リセプター機能を持つ RNA-ペプチド複合体 (リボヌクレオペプチド) の作製は、本研究が初めての例であり、近年、生体内の RNA-ペプチド複合体 リボソームの機能が注目を集めていることから、今後の展開が期待される。

5.2 ATP 結合性 RNP リセプターの段階的機能化

従来、段階的機能進化を行う際、三次元構造が明かなリセプターや酵素の場合は、有効であると考えられる場所に点変異を導入する方法がとられてきたが、既存機能を保持しながら新規機能を付加することが困難であった。本研究の手法では、リセプターを作製する際に、段階的に認識面を作製する事が可能であり、より柔軟性のある機能設計が可能になった。これまでに開発した方法論を用いて、「化学反応の出発物質に結合するが、生成物との結合能は低い」RNP リセプターを作製し、段階的機能化法によって、「化学反応の遷移状態に結合するが生成物との結合能は低い」分子認識能を付加することにより、テーラーメイド酵素が作製できると考えている。現在までに、リン酸化チロシン含有アミノ酸配列に結合するリボヌクレオペプチドの作製には成功しており、今後、リン酸化チロシン含有アミノ酸配列の加水分解遷移状態アナログにも結合するように、ペプチドサブユニットの段階的機能進化を試みる。

5.3 RNP リセプターを用いたセンサーの開発

従来の分子センサー作製法では、リセプターを作製した後に蛍光分子で化学修飾して機能評価をすることが必要であり、リセプターが容易に手に入る場合でもセンサーへと機能変換するためには多大な労力が必要であった。これらに対して、本手法はテーラーメイドリセプターの機能を損なうことなく分子センサーを作製するための効率的な手段となる。この手法により、様々な生理活性物質、タンパク質に対して、「選択的結合をおこなう」、「幅広い濃度範囲での検出が可能」、「リガンド結合時に蛍光強度変化が大きい」、そして「望みとする波長で発光する」テーラーメイドセンサー素子が簡便に作製できると期待される。

5.4 タンパク質をもとにした二つのサブユニットからなる機能性組織体

タンパク質ドメインを分割したのち再構築するという概念はすでに報告されており、本研究はその延長線上にあるが PH ドメインについては本研究が最初の例である。この発見は、天然タンパク質 PH ドメインに段階的・協奏的機能進化法が適用できる可能性を示している。

5.5 PH ドメインを用いた蛍光センサー

本研究の遂行中に、細胞内で IP_3 を可視化する方法として PH ドメインに蛍光性タンパク質 GFP を融合させた PH-GFP を用いる方法が他の研究グループにより発表された。この方法は、膜表面のホスファチジルイノシトール (PIP_2) に結合した PH-GFP をマーカーとしており、このマーカーが PIP_2 の加水分解により生成した IP_3 に結合することでセンシングを可能にしている。この方法では IP_3 濃度変化に対応した蛍光強度変化が測定できなかったが、本さきがけ研究において、 IP_3 濃度変化の測定を可能とした。基本骨格として用いた IP_3 センサー (3.2) の IP_3 選択性は細胞内導入ペプチドを付加した細胞内 IP_3 センサーにおいても保持されており、細胞膜に存在する PIP_2 に対して天然の PH ドメインは強く結合するが、細胞内 IP_3 センサーの PIP_2 に対する結合はほとんど観測されなかったことから、 IP_3 に選択的な細胞内リアルタイムセンサーへの活用が期待される。

5.6 まとめ

さきがけ研究の三年間において、我々は RNA とペプチドもしくはタンパク質をもとにした、二つのサブユニットから形成される組織体を段階的に機能化する方法論を開発した。この方法論を用いて、ATP、 NAD^+ 、リン酸化チロシン含有ペプチドに対するテラーメイドリセプターを作製することに成功した。また、リセプターをもとにしてテラーメイド・センサーを作製する方法論を開発した。この方法論により、多様な種類の生理活性物質やタンパク質に対してリボヌクレオペプチド・センサーを作製し、生理活性物質および環境因子を微量・迅速に計測できるマイクロアレイや細胞内バイオセンサーが開発できると考えている。

二つのサブユニットからなるテラーメイド酵素作製法を確立するためには、未だにいくつかの課題が残されている。まず、二つのサブユニットが有効に触媒機能に寄与できるように、基質の配向性を制御する方法論の開発が必要である。また、現在進行中の研究では、テラーメイド酵素を作製するために「出発物質」と「化学反応の遷移状態アナログ」には親和性が高く、「生成物」には親和性が低いという性質のリボヌクレオペプチドを作製している。今後は、さきがけ研究で開発した方法論を用いてテラーメイド酵素が作製できるかを検証するとともに、天然の酵素に見られる「化学反応を触媒する過程で活性部位の構造変化を伴う」という特徴を設計することにより、新しい酵素作製法を提唱することを目指したい。

6. 研究総括の見解：

基質認識と反応性のサブユニットを組み合わせたセンサー、人工酵素の設計と製作を行い、いくつかのペプチドセンサーを製作することで、段階的な機能追加が可能であることを示した。人工酵素製作だけでなく、この方法によるセンサーなどの応用展開にも期待したい。

7. 主な論文等：

発表論文

1. A General Strategy to Determine a Target DNA Sequence of Short Peptide: Application to a D-Peptide. Morii, T.; Tanaka, T.; Sato, S.; Hagihara, M.; Aizawa, Y.; Makino, K., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 180-181.
2. Structure-Based Design of a Leucine Zipper Protein with New DNA Contacting Region. Morii, T.; Sato, S.; Hagihara, M.; Mori, Y.; Imoto, K.; Makino, K. Biochemistry 2002, 41, 2177-2183.
3. A new fluorescent biosensor for inositol trisphosphate. Morii, T., Sugimoto, K., Makino, K., Otsuka, M., Imoto, K., Mori, Y., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 1139-1140.
4. In vitro selection of ATP-binding receptors using a ribonucleopeptide Complex. Morii, T., Hagihara, M., Sato, S., Makino, K., J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 4617-4622.
5. Functional reassembly of a split PH domain. Sugimoto, K., Mori, Y., Makino, K., Ohkubo, K., Morii, T., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 5000-5004.
6. Amplification of receptor signalling by Ca^{2+} entry-mediated translocation and activation of PLC β 2 in B lymphocytes. Nishida, N., Sugimoto, K., Hara, Y., Mori, E., Morii, T., Kurosaki, T., Mori, Y., EMBO J. 2003, 22, 4677-4688.

総説

1. Chemical Approach to Untangle the Sequence-Specific DNA Binding by Proteins. Sato, S.; Hagihara, M.; Sugimoto, K.; Morii, T., Chem-Eur. J. 2002, 22, 5067-5071.

招待講演 国内 2 件、海外 3 件、
特許 4 件