コンビナトリアルケミストリー法および ダウンサイジング法による機能性核酸 および機能性ペプチドの開発

杉本 直己*

Development of Functional Nucleic Acids and Peptides by Combinatorial Chemistry and Downsizing Methods

Naoki Sugimoto*

Development of functional nucleic acids and peptides by combinatorial chemistry and downsizing methods is described. First, catalytic short RNAs (ribozymes) and DNAs (deoxyribozymes) are made and the metal ion effect on their activity is discussed. Surprisingly, these small nucleic acids can cleave RNA substrates at only one site precisely. Second, a novel and only 24 residue peptide derived from RecA protein can discriminate a single-stranded DNA (ssDNA) from a double-stranded DNA (dsDNA). A new developed support with this peptide recognizes ssDNA but not dsDNA. Finally, a novel screening method of combinatorial chemistry and its application for studying interactions between life molecules including sugars are reviewed.

Key words: nucleic acid, ribozyme, deoxyribozyme, metal ion, peptide, RecA, combinatorial chemistry, sugar, interactions between life molecules

はじめに

化学の一分野として、「生体機能関連化学」の研究分野が生まれて、もう何年になるのであろうか。ご存知のように、この分野は日々躍進を遂げ、初期の“生体・生命分子に似せる”ような分子を開発するバイオメテックスケミストリーから、近年では“生体・生命分子を超える”ような分子を開発するスプラモレキュラーケミストリーへと発展し続けている。一方、「生物科学」においてもリボザイムのような新しい機能を有する分子が見いだされたのをきっかけに、超天然型分子の探索が始まりつつある。

従来の「生体機能関連化学」や「生物科学」の分野から、生命分子・天然分子のダウンサイジング法、インビトロセクション法、コンビナトリアルケミストリー法、ファージディスプレイ法などのニューバイオテクノロジーがほぼ時期を同じくして開発され、新しい機能性分子や材料の探索・創製を行う新しい「生命化学」の分野が21世紀に向けて形成されつつある。

ニューバイオテクノロジーのうち、どのような目的でバイオメテックス分子や超天然型分子を探索するのかにより、それぞれの特徴を活かした方法を選択する必

要がある。簡単に言えば、インビトロセクション法、コンビナトリアルケミストリー法、ファージディスプレイ法は、非常に多様な分子集団をそれぞれの方法で提示させ、そこから基質やターゲット分子に対して特異的活性を持つ分子を選択する方法である(表1)。これに対してダウンサイジング法は、生命分子や天然分子における活性部位を部分的に取り出す方法、つまりモデル化である。これら手法の中で、特に重要な化学的手法は、ダウンサイジング法とコンビナトリアルケミストリー法である。そこで本稿では、この2つの方法を主に紹介する。

まず、ダウンサイジング法は、バイオメテックスケミストリーにおいて多用され、生命分子間の相互作用の詳細な検討などに広範に用いられている。ダウンサイジング法を用いて設計したモデル化合物で生命分子の機能や構造を再現するには、もとの分子の配列や構造に関する情報、さらに活性部位などの情報が必要である。また、活性部分のみを取り出しても、そのモデル分子が目的の機能活性構造を形成できない場合もある。つまり、生命分子からモデル化合物を創製する場合には、ある程度の情報や経験が必要である。しかし、情報に従いモデル化合物を創製できれば、単純化した系で合成や解析ができるので、そのメリットは非常に大きい。

コンビナトリアルケミストリー法は、多様性を持った分子ライブラリーを化学的に合成し、そこからターゲットや基質に特異的に認識や活性をもつ分子を選択する方法である。コンビナトリアルケミストリー法は、機能活

* 甲南大学理学部化学教室、ハイテクリサーチセンター

* Department of Chemistry, Faculty of Science and High Technology Research Center, Konan University

Table 1 Comparison of screening methods of *in vitro* selection, combinatorial chemistry, and phage display.

	<i>In Vitro</i> Selection	Combinatorial Chemistry	Phage Display
Library	Free DNA, Free RNA	Immobilized peptides (Any amino acids)	Free peptide (20 Natural amino acids)
Diversity	4 ⁿ (n = 30~220)	20 ⁿ (n = 5~6)	20 ⁿ (n = 5~40)
Available molecules for a selection	10 ¹³ ~10 ¹⁵	10 ⁵ ~10 ⁶	10 ⁷ ~10 ⁹
Amplification	PCR	—————	Infection to <i>E.coli</i>
Determination of functional molecules	DNA sequencing	Peptide sequencing	DNA sequencing

性や構造に関する情報が全くない場合にも使用できる。しかし、ビーズ上やスポット上で合成や選択操作を行うことが多く、スケールの制限される場合が多い。また、ターゲット分子と選択される分子の結合力が弱く、選択操作においても制約が多い。

このように、ダウンサイジング法とコンビナトリアルケミストリー法には、それぞれに長所と短所が存在する。これらのテクニックを用いるためには、短所をうまくカバーし長所を有効に活用しなければならない。また、これらを補完的に用いることができれば、超天然型分子を探索・創製するうえで、さらに強力なテクニックとなる。

以下の章では、筆者らが行った超天然型分子の創製と応用の事例を通して、2つのテクニックについて詳述する。

1. 機能性核酸のダウンサイジング

1.1 リボザイムのダウンサイジング

リボザイム(ribozyme)は、核酸の切断や連結反応の触媒機能を有するRNAである¹⁾。リボザイムに関する研究は、その反応の特異性や核酸薬剤への応用などの観点から注目されており、核酸の研究分野でも特に重要な位置を占めている。核酸切断機能を有するリボザイムとして、テトラヒメナ・リボザイム、ハンマーヘッド・リボザイム等がよく知られている。これらのリボザイムは、その活性に金属イオンを必要とするメタルエンザイムであるため、金属イオンとリボザイム活性の関係が盛んに研究されている。しかし、これらのリボザイムは数百から数十ヌクレオチドと比較的大きな分子であるため、触媒機能と構造に関しての分子レベルでの普遍的な法則の解明は困難であった。

金属イオンとリボザイム活性の関係における法則性を詳細に検討するには、活性部位ができるだけ単純な短鎖

リボザイムの反応系を開発することが肝要である。従来の短鎖リボザイムの代表は、約30塩基からなるハンマーヘッド・リボザイムである。しかし、このリボザイムはU-turn構造という特殊な構造を含んでおり^{2,3)}、また小型ハンマーヘッド・リボザイム(ミニザイム)も、その活性にはミニザイム同士でのホモダイマー形成が必須であることが示されている⁴⁾。これらの点で、ハンマーヘッド・リボザイムは、単純なリボザイム系とはいえない。そこで筆者らは、ダウンサイジング法を用いて、さらに短鎖のリボザイム系の開発を試み、リボザイム活性における金属イオンの役割を検討した。

まず最初に、ダウンサイジング法の基本分子として、インビトロセクションによって見つかった、Pb²⁺に依存する自己切断RNA(レッドザイム)⁵⁾を選択した。このレッドザイムは、Pb²⁺存在下、3'側の末端に2',3'-環状リン酸、5'側末端に5'-水酸基を持った切断産物ができる自己切断反応を引き起こす⁶⁾。この切断反応が分子間でも進行すれば、ハンマーヘッド・リボザイムよりも小さな活性部位をもつリボザイム系となりえると予測した。すなわち、自己切断構造からヘアピンループを取り除いて分子間で切断反応が進行する、10塩基からなるオリゴリボヌクレオチド・リボザイム、r(CUG-GGAGUCC)を分子設計した(図1)。

さて、その活性はというと、このオリゴヌクレオチドは、50 μM Pb²⁺存在下で、12塩基からなる基質RNA、r(GGACC ↓ GAGCCAG)のC ↓ G部位の間を特異的に切断することが示された(図1)⁷⁾。つまり、ダウンサイジング法を用いることにより、最小のリボザイム系を構築することができた。さらに、本リボザイムの活性に対する金属イオンの効果を検討したところ、25 μM Pb²⁺と25 μM 希土類イオン、特にNd³⁺との協同効果により、50 μM Pb²⁺単独のときよりも、反応時間20分で切断効率が約4倍増加することが明らかとなった(図

Fig. 1 Dependence of cleavage yield on (a) divalent and trivalent ions, and (b) rare earth ions at 25 °C. Reaction time was 20 min.

1)。さらに、切断反応における Pb^{2+} と Nd^{3+} の詳細な役割を検討するために、 Pb^{2+} と Nd^{3+} の混合比を変化させて切断反応の速度解析を行ったところ、切断反応は Pb^{2+} と Nd^{3+} の濃度比が 1:1 のときに最大となることが示された。この結果から、反応点部位では、 Pb^{2+} が塩基触媒として、 Nd^{3+} が酸触媒として作用して、RNA の切断反応が進行する two-metal ion メカニズムの可能性が示された⁸⁾。

また、リボザイムの活性部位の 2'-OH の役割を検討するために、DNA を導入した 2 種類のキメラ型リボザイム [rCUGG(dG)rAGUCC, rCUGGG(dA)rGUCC] を作製した。活性を調べた結果、基質の切断部位に最も近い A の 2'-OH が、切断に直接関与する Pb^{2+} との結合に寄与し、一方 A の 5' 側の G の 2'-OH は基質 RNA と水素結合を形成していることが示された⁹⁾。つまり、短鎖リボザイムの反応において、テトラヒメナ・リボザイムやハンマーヘッド・リボザイムで推測されていた、活性部位の 2'-OH の重要性が明らかになった。このように、ダウンサイジング法により短鎖リボザイムを創製できると、リボザイム活性に対する金属イオンの効果やリボザイムの反応メカニズムを分子レベルで明らかにできることになる。

2.2 デオキシリボザイムのダウンサイジング

DNA は、遺伝情報を伝達・維持する生命分子である。この DNA を、リボザイムと同様に、生体内反応を触媒する機能性材料として用いる試みがなされている。このような DNA 分子はインビトロセクションにより発見され¹⁰⁾、デオキシリボザイム (deoxyribozyme) と呼ばれている。例えば、DNA 鎖の連結機能を有しているデオキシリボザイムは、活性時に Mg^{2+} 、 Cu^{2+} または Mg^{2+} 、

Zn^{2+} の 2 種類の金属イオンの組み合わせを必要とする^{11,12)}。筆者らは、デオキシリボザイム-基質 RNA 複合体の二次構造形成に関与する金属イオンの影響について、表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) を測定した結果、 Cu^{2+} がデオキシリボザイムの連結機能の活性種としての役割を担っていることを明らかにした¹²⁾。

核酸の連結・切断以外の反応を触媒する DNA も発見されている。例えば、ポルフィリンは、その中央の空孔部に金属イオンを配位させることで、特異な光応答性などに関与する重要な生体分子であるが、このメタレーション反応を促進するデオキシリボザイムが発見されている^{13,14)}。このデオキシリボザイムも、反応遷移状態と類似したポルフィリンに結合する DNA をインビトロセクションすることにより見いだされた^{15,16)}。このデオキシリボザイムの塩基配列は、染色体末端に存在するテロメア配列に類似した塩基配列であった。筆者らは、ダウンサイジング法を用いて、さらに短鎖で 18 塩基の DNA、d(GTGGGTTGGGTGGGTTGG) が、同様の触媒作用および活性構造を保持することを明らかにした¹⁷⁾。この DNA 鎖は K^+ 存在下で天然酵素 (ferrochelatase) と同程度の活性を有していることが明らかとなった。このデオキシリボザイムの触媒メカニズムを検討したところ、図 2 に示すようなグアニン四量体構造を含む G-ワイヤー構造がメタレーション反応を促進する構造であることが示唆された。つまり、グアニン四量体構造がポルフィリンのメタレーション反応の場を提供していることが確認された。

リボザイムと同様に RNA 鎖や DNA 鎖を切断するデオキシリボザイムもインビトロセクションにより発見

Fig. 2 Predicted mechanism of porphyrin metallation by a deoxyribozyme which forms G-wire structure.

された^{18,19)}。特に、RNA鎖の切断機能を有するデオキシリボザイムは、ハンマーヘッド・リボザイムなどと同様またはそれ以上の切断効率を有していることが明らかとなった。このデオキシリボザイムは、基質認識部位と活性部位(ループ部位)の2箇所の部位から構成されている(図3a)。このデオキシリボザイムのループの鎖長を短くすることで、より選択性や特異性に優れた機能性材料になる可能性がある²⁰⁾。

そこで筆者らは、ダウンサイジング法を適用するための情報を得るために、オリジナル・デオキシリボザイムのRNA鎖の切断活性に対する金属イオンおよびループの塩基配列について系統的に検討した。ループ内の塩基

配列を検討するにあたり、リボザイムの構造解析の結果を参考にした^{21,22)}。リボザイムにおいて、G・AやG・Uのような非ワトソン・クリック型塩基対が、金属イオンの配位および活性構造形成に重要である。そこで、デオキシリボザイムのループ内を、元の塩基配列より短い鎖長で、非ワトソン・クリック型塩基対の形成ができるように変異型デオキシリボザイムを約30種類を新たに設計した。オリジナル・デオキシリボザイムで高い活性を示す Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} の金属イオン存在下で活性を検討した結果、オリジナルのループから4ヌクレオチド、 $\text{d}(\text{A}_5\text{G}_6\text{C}_7\text{T}_8)$ を取り除いた図3bのデオキシリボザイムが、 Ca^{2+} 存在下で、オリジナル・デオキシリボザ

Fig. 3 Secondary structures of the complexes of (a) the original or (b) short Ca^{2+} -dependent deoxyribozyme and its RNA substrate.

定化すると、L2-G ペプチドが結合できるヌクレオチドに対してのみシグナル上昇が観測される。320 μM の残基濃度のヌクレオチド鎖を L2-G ペプチドを固定化したセンサーチップに流したところ、核酸の種類によってシグナルの上昇が大きく異なることがわかった。ヌクレオチドを 300 秒間流した後のシグナル上昇(応答単位 RU で表現される)は大きい順に、d(ACCTAGTC) (1200 RU) >> r(ACCUAGUC) (400 RU) > 2'-5' U₈ (200 RU) > dT₈(-C₂H₅) (50 RU) となった。この結果は、L2-G ペプチドが天然型の一本鎖 DNA に強く結合することを示している。一方、r(ACCUAGUC) と 2'-5' U₈ に対しては、d(ACCTAGTC) と同じ負電荷数を有しているものの、L2-G ペプチドの結合はかなり弱いものであることがわかった(中性電荷の dT₈(-C₂H₅) とはほとんど結合しなかった)。すなわち、L2-G ペプチドは一本鎖核酸の負電荷を認識しているというよりも、むしろその骨格構造を認識していることが示された。二本鎖の d(GTCAGGAATCTG)/d(CAGATTCCTGAC) に対しては 100 RU とほとんどシグナル上昇は見られず、高濃度(6 mM)の二重鎖を用いてもシグナルは 200 RU しか上昇しなかった。また、ヘアピン型 DNA に対するシグナル上昇は比較的大きく(450 RU)、L2-G ペプチドは A₈ のヘアピンもしくはインターナルループの一本鎖に結合することも示唆された。これらの結果から、L2-G ペプチドは天然型の一本鎖 DNA にのみ強く結合することが明らかになった。

核酸と L2-G ペプチドとの相互作用の定量化も行った。ここでは結合の化学量論を知るために一本鎖 DNA としてポリマーの poly(dT) を用いた。一本鎖 DNA との結合に伴う Tyr の蛍光強度変化を利用して、DNA の滴定曲線から 100 mM NaCl-リン酸緩衝溶液中、20 $^{\circ}\text{C}$ での L2-G・DNA 複合体の安定化エネルギーとペプチド 1 分子によるヌクレオチドの占有数を算出した。ここでヌクレオチドの占有数とは、1 分子のペプチドがヌクレオチドに結合したために、ペプチドと結合できなくなった近傍のヌクレオチド数のことである。L2-G ペプチドは poly(dT) に対して $-7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ の安定性で結合し、占有ヌクレオチド数はおおよそ 4.3 であることが見いだされた。この実験条件下では poly(dA-dT) 鎖は安定な二重鎖構造を形成するが、すべてのヌクレオチド残基が二重鎖を形成しておらず、L2-G ペプチドが結合できる一本鎖やループ領域も共存している。そこで、一本鎖領域への結合も考慮して L2-G ペプチドの二重鎖部位への結合安定性を検討した結果、二重鎖部位には $-3.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ で結合することが示された。このようにダウンサイジング法で開発した 24 残基という短鎖ペプチドで、一本鎖と二重鎖核酸構造を 1000 倍以上もの結合能

の差で識別させることができた。

3.2 ダウンサイジングタンパク質の応用

L2-G ペプチドの一本鎖 DNA 認識能力を利用して一本鎖 DNA を認識するカラム担体の開発を試みた。ポリスチレン(PS)樹脂上のポリエチレングリコール(PEG)末端(PEG-PS-HCl 樹脂)に L2-G ペプチドを固定化したものをカラム担体とした。比較のためにペプチドを担持していない PEG-PS-HCl 樹脂を用いたカラム担体も準備した。これらのカラムに 1.3 nmol の一本鎖 DNA、d(TAATACGACTCACTATAGGG)、もしくは二重鎖 DNA、d(TAATACGACTCACTATAGGG)/d(CCC-TATAGTGAGTCGTATTA) を注入した。そして、L2-G ペプチドを担持した樹脂と担持していない樹脂の入ったカラムから流出させた溶液の 260 nm における吸光度の差から L2-G ペプチドに結合した核酸の割合を算出し、その結果を図 5 に示した。二重鎖 DNA は、L2-G ペプチドが担持した樹脂と 60 分間混合させても、樹脂上の L2-G ペプチドにはほとんど結合しなかったが、一本鎖 DNA は混合後 10 分で溶液中に含まれる DNA の 94 % がカラム担体に結合し、60 分後にはほぼ 100 % の DNA がカラム担体に結合することがわかった。このように L2-G ペプチドの核酸構造識別能力を利用することによって一本鎖 DNA 認識カラムの開発に成功した³⁸⁾。このような核酸構造認識カラムは、ポストヒトゲノム計画などにも関連して、様々な分野に応用が可能である。天然のタンパク質を用いてはこのような簡便なカラムの開発は困難であり、ダウンサイジング法の有用性を示す結果である。

Fig. 5 Binding properties of L2-G columns to d(TAATACGACTCACTATAGGG) and d(TAATACGACTCACTATAGGG)/d(CCC-TATAGTGAGTCGTATTA) at a room temperature after 10 or 60 min mixing.

4. コンビナトリアルケミストリー

天然の生命分子の構造や機能をお手本として機能性分子を開発するダウンサイジング法に対し、コンビナトリアルケミストリー法は手本を天然に求めないのが特徴である。有用な手法ではあるが(コンビナトリアル合成の詳細については、数多くの総説や成書が出版されているので参考いただきたい³⁹⁾)、問題点も多い。コンビナトリアルケミストリー法でターゲット分子が低分子量化合物の場合、ペプチドライブラリーとの結合力が比較的弱いことが多い。また、ライブラリーからの選択に際しては、基質やターゲット分子に標識化合物の導入が必要とされる。それ故、ペプチドライブラリーによる標識化合物の認識が目的の反応と競合するという問題が生じ、ビーズ上での選択操作が非常に困難となる。本章では、以上のような問題を解決するために筆者らが開発した新規選択方法を示すとともに、コンビナトリアルケミストリー法がもたらす情報について紹介する。

4.1 新規のスクリーニング方法の開発

筆者らは、低分子量化合物に特異的に結合するペプチドの取得を目的として、コンビナトリアルケミストリー法を用いてトリプトファンを特異的に認識する短鎖ペプチドの開発を行った。ライブラリーは、Cys をのぞく 19 種類の天然アミノ酸による 5 残基のライブラリー(X-X-X-X-X: X は Cys を除く 19 種の天然アミノ酸)を用いた。このライブラリーの中には、 10^5 で約 248 万種類のペプチドが理論上含まれていることになる。

Trp 結合性ペプチドを取得する上で、アビジン-ビオチンの高親和性(結合定数 K_a は約 10^{15} M^{-1})を利用した新規スクリーニング方法を開発した(図 6)⁴⁰⁾。この選択方法は、2 段階の選択操作から構成される。第 1 段階として、Trp の N 末端側に親水性リンカーとメチレンリンカーを介してビオチンが導入された標的分子を、ペンタペプチドライブラリーと結合させた。次いで、標的分子とライブラリー間における非特異的な相互作用を排除するため、リン酸緩衝溶液でライブラリーの洗浄を行った。ここで、使用したすべての溶液を回収し、ライブラ

リーと相互作用していない遊離の標的分子のモル数を算出した。使用した溶液の総液量は既知量であり、かつ遊離の標的分子濃度は水溶液中での Trp のモル吸光係数を用いて容易に算出することができる。この操作によりライブラリーに結合している標的分子の総モル数を逆算したところ、 1.6 pmol の標的分子がライブラリーと何らかの相互作用様式で結合していることが明らかとなった。この段階におけるペプチドと標的分子との間における相互作用には、図 6 の模式図に示すように 3 つの相互作用様式が考えられる。1 つは図 6A の、標的分子の Trp 部位(W)とペプチドの相互作用、2 つめは図 6B の標的分子のビオチン部位(B)とペプチドの相互作用、3 つめが図 6C の標的分子のリンカー部位とペプチドの相互作用である。上述した相互作用様式の中で、目的とする相互作用は、最初に示した Trp 部位とペプチド間の相互作用のみである。つまり、この相互作用のみが選択的に検出され、その他の相互作用様式は排除されなくてはならない。

そこで、第 2 段階として、第 1 段階終了後のライブラリーにフルオレセイン(P)標識化ストレプトアビジン(A)を加えた。この操作により、第 1 段階目においてトリプトファン部位が認識されている標的分子のビオチンは、 10^{15} M^{-1} にもものぼる高い結合定数を有するアビジン-ビオチン複合体を形成する。すなわち、Trp 部位とペプチドが相互作用している樹脂上にも、フルオレセインが提示され、蛍光発光を指標としたスクリーニングが可能となる。第 1 段階の図 6B のような相互作用は、ビオチンがより親和性の高いストレプトアビジンと結合するために、系から排除される。また、図 6C のようなリンカー部位での相互作用は、アビジンがペプチドとの結合と近いために、アビジン-ビオチン複合体形成が阻害されるため、同様に排除される。また、ストレプトアビジンやフルオレセインがペプチドと相互作用する場合も考えられるが、これは加える標識化ストレプトアビジンの濃度を調節することにより抑制可能である。すなわち、新たに考案した 2 段階のスクリーニング方法では、目的外の相互作用はすべて排除され、目的とする Trp とペプチド間の相互作用のみが検出できる。

ライブラリー洗浄の後、フルオレセインに対応する 494 nm 励起光照射下で蛍光顕微鏡による観察を行った結果、図 7 に示すようにおよそ数万個に 1 個の割合で特異的に蛍光を発する樹脂が確認された。その樹脂上のペプチドのアミノ酸配列を決定した。約 248 万種

Fig. 6 Schematic drawing of the new selection method using avidin-biotin interaction.

もの分子種を有するペプタイドライブラリーから選択された 目的の 10 種のペプタイド配列のうち、5 種類の配列が共通配列として、Tyr/His-Gly-Gly-Tyr と His-Pro-Gly-His を含んでいた。得られた共通配列の 1 つを含む Glu-His-Gly-Gly-Tyr をモデルペプタイドとし、これと Trp の結合定数を求めたところ、25 °C において、 $1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であることが見いだされた。つまり、本法は、 10^3 M^{-1} 程度の低親和性の相互作用にも適用できることが示された。

Fig. 7 A photomicrograph of positive beads in our screening method.

4.2 Trp 結合性ペプタイドの開発

得られた共通配列、Tyr/His-Gly-Gly-Tyr と His-Pro-Gly-His 中の、Gly-Gly および Pro-Gly はターン構造中に多く見られる。X 線解析から得られた蛋白質の構造情報を基礎としたターン構造のパラメータ⁴¹⁻⁴³⁾ からこれらのモチーフがターン構造を取る可能性が高いことが示唆される。すなわち、ペプタイドが中央部分でターンし、2つの芳香環が向かい合う構造が、Trp との結合に重要であると考えられる。

アミノ酸残基を、N 末端側から i , $i+1$, $i+2$, $i+3$ 番目と数えると、共通配列中の i 番目の残基と $i+3$ 番目の残基は、いずれも芳香族性のアミノ酸である。さらに、 $i+2$ 番目の残基はいずれも Gly である。このようなモチーフが、 β -ターン構造をとる例はすでに報告されている^{44,45)}。これらのモチーフが β -ターン構造を形成した場合、 i 番目と $i+3$ 番目の芳香族性側鎖は同一方向に配向される。このペプタイドに Trp が相互作用した HGGY-Trp 複合体の最安定構造を分子モデリングにより算出した結果を図 8 に示した。His-Gly-Gly-Tyr モチーフは β -ターン構造を形成し、His や Tyr の芳香族性側鎖が同一方向に配向され、これらの芳香族性側鎖間に Trp のインドール環が挟み込まれる相互作用様式が示されている。つまり、Trp のインドール環とペプタイドの芳香族性側鎖間に生じるスタッキング相互作用が、複合体の安定化に大きく寄与していると考えられる。しか

しながら、得られた芳香族性側鎖は挟み込みに最も有利に働くと考えられる Trp ではなく、His や Tyr といった極性官能基を有する芳香族性側鎖が得られたので、スタッキング相互作用とともに、これら極性官能基の形成する水素結合も Trp 認識に関与しているようである。

Fig. 8 Structure of motif peptide (Ac-His-Gly-Gly-Tyr-NH₂)-target (H-Trp-OH) complex obtained with QUANTA 97.1/CHARMM 23.2.

ここで得られた His-Gly-Gly-Tyr モチーフは、Trp をサンドイッチング相互作用によって捕捉している。これまでに、ポリフィリン(H₂TMpyP)を標的とした樹脂結合型のバイアスドライブラリーからは、Tyr-Ala-Gly-Tyr モチーフが得られている⁴⁶⁾。またファージディスプレイ法により H₂TMpyP 結合モチーフとして His-Ala-Ser-Tyr-Ser が得られている⁴⁷⁾。これら双方のモチーフにおいても、H₂TMpyP といった芳香族性の低分子量化合物をペプタイドがサンドイッチング相互作用により捕捉している。

これらの結果から、ペプタイド-芳香族性低分子量化合物の複合体の安定化には、スタッキング相互作用と水素結合が寄与するサンドイッチングが重要であることがわかった。また、これらの結果は、コンビナトリアルケミストリー法により取得されたペプタイドの基質認識メカニズムが、天然分子やファージディスプレイ法などの手法により選択されてきたペプタイドと同様であることを示しており、コンビナトリアルケミストリー法がバイオミメティックスや超天然分子の探索において、非常に強力なツールとなることを示すものである。

4.3 DNA テトラループ結合性ペプタイドの開発

ペプタイド-芳香族性低分子量化合物の複合体の安定化には、スタッキング相互作用と水素結合が重要な寄与をすることがわかったが、ペプタイドと核酸の相互作用においてはいかがであろうか。熱力学的に安定なテトラループ構造を有する DNA(dA₁G₂G₃C₄T₅T₆C₇G₈G₉C₁₀C₁₁T₁₂; T₅ から G₈ まだがループを形成する)をターゲット分子とし、特異的に認識するペプタイドの選択を試み、その認識メカニズムを検討した。上記の DNA(コア)および、その 6 番目のチミンをアベシクヌクレオチドに置換した DNA(AP2)をターゲット分子とした(図 9)。その

結果、コアに対して得られたペプチドには Try/Tyr/His といった芳香族性アミノ酸が多くみられ、AP2 に対して得られたペプチドでは Asp/Gln といった水素結合性アミノ酸がみられた。

Fig. 9 Secondary structures of the DNA hairpin loops. X denotes an abasic nucleotide.

コアに対して得られた His-Trp-His-His-Glu (HWHHE) ペプチドに注目し、まず、コア、AP2 にペプチドを加えて、UV 融解曲線を測定した。この測定によってペプチドによる核酸側の安定性変化を追跡することができる。その結果、コア-HWHHE 複合体の融解温度はコアだけの時と比べて約 3℃ 減少したのに対し、AP2 に HWHHE を加えても融解温度には変化がなかった。UV 融解曲線からカーブフィッティング法を用いて熱力学的パラメータを算出したところ、コアは HWHHE と複合体を形成することによって約 1 kcal mol⁻¹ 不安定化する(核酸塩基のスタッキングか水素結合が崩壊しているのかもしれない)のに対して、AP2 の安定性に HWHHE は影響を及ぼさなかった。次に、相互作用している部位を特定するためにペプチド溶液に核酸を滴下し、HWHHE ペプチドの Trp の蛍光消光を追跡した。その結果、360 nm 付近のコアの場合の蛍光強度が AP2 と比

Fig. 10 Molecular structure of a complex between core DNA with a hairpin loop and HWHHE peptide obtained with QUANTA 97.1/CHARMm 23.2.

べて約 3 倍も減少することが明らかになった。さらにコアとペプチドの結合定数を算出したところ、結合定数は 25℃ でおよそ 10⁻⁴ M⁻¹ であることが示された。これらの測定結果をふまえて QUANTA 97.1/CHARMm 23.2 を用いて分子モデリングを行った(図 10)。核酸の初期座標は Tinoco らの NMR の結果を用いた⁴⁸⁾。その結果、ループアウトした 6 番目のチミン塩基と芳香族アミノ酸の Trp がスタッキング相互作用する可能性が示された⁴⁹⁾。

5. ダウンサイジング法とコンビナトリアルケミストリー法を組み合わせる：単糖を特異的に多点認識できるペプチドの開発

レクチンをはじめとする糖結合性タンパク質は、免疫など重要な生体反応に関与していることが知られている⁵⁰⁻⁵²⁾。よって、糖-蛋白質相互作用の定量的解析は、生体反応のメカニズムの解明や上記の疾患に対する薬剤の開発などに非常に有用であると考えられる。糖と蛋白質複合体の親和性には、CH- π 相互作用と水素結合の両者が大きな役割を果たしていると考えられている⁵³⁾。複合体における CH- π 相互作用は、蛋白質の芳香環と糖のアセチル基間に形成される相互作用であり^{53,54)}、水素結合は主に Asp や Glu 等の側鎖と糖の水酸基間に形成される。実際に、糖と蛋白質複合体の X 線構造解析の結果からは、結合部位近傍に芳香環を持つ残基と塩基性残基が多く見られる⁵⁵⁻⁵⁷⁾。

このような生体反応のメカニズムの定量的解析には、モデル系の構築が非常に有効な手段であるが、現在までに、上記の両方(CH- π 相互作用と水素結合)の相互作用を含み、かつ低分子同士での蛋白質-糖相互作用のモデル系を構築できた例はない。その理由として、相互作用の形式が、弱い相互作用による多点認識であることが挙げられる。特に水素結合は、電子供与部位と受容部位の距離と方向が非常に厳密に要求される⁵⁸⁾。よって、天然の蛋白質の結合部位もしくは活性部位を単純に取り出しても、期待どおりの相互作用を達成することは不可能である。

そこで、ダウンサイジング法とコンビナトリアルケミストリー法を組み合わせ、糖結合性タンパク質のモデルペプチドの構築を試みた。ダウンサイジング法により CH- π 相互作用を、コンビナトリアルケミストリー法により、厳密に距離と方向が要求される水素結合をモデル化する試みである。CH- π 相互作用と芳香環の位置との関係を検討するために、表 2 のペプチドを設計した。糖の非存在下と存在下のペプチドの蛍光強度を測定した結果、CH- π 相互作用で単糖を認識するためには、ペプチドは芳香環を i と $i+4$ 番目に持つことが必要であるこ

Table 2 Peptide sequences used in this section^a.

S peptide		L peptide	
Abbreviation	Sequence	Abbreviation	Sequence
S i+1	KWW	L i+0	KAAAAWAAAAAAAAAK
S i+2	KWAW	L i+1	KAAAAWAAAAAAAAAK
S i+3	KWAAW	L i+2	KAAAAWAAAAAAAAAK
S i+4	KWAAAW	L i+3	KAAAAWAAAAAAAAAK
S i+5	KWAAAAW	L i+4	KAAAAWAAAAAAAAAK
S i+6	KWAAAAAW	L i+5	KAAAWAAAAWAAAAAK
		L i+6	KAAWAAAAWAAAAAK

^a S and L peptides show short and long peptides, respectively.

とが明らかとなった。

もう1つの相互作用様式である水素結合をモデル系に導入するために、コンビナトリアルケミストリー法を用いた。ダウンサイジング法により得られた情報をもとに、 i と $i+4$ 番目に芳香環を持つ3種類のアミノ酸 (Trp, Tyr, Phe; 一般に Aro) のいずれかをランダムに導入し、 $i+1$ から $i+3$ までの3残基には Cys を除く19種類のアミノ酸 (X) をランダムに導入したペプチドライブラリーを構築した (Aro-X-X-X-Aro)。よってこのライブラリーには、 $3 \times 19 \times 19 \times 19 \times 3 \div 62000$ 種類のペプチドが含まれていることになる。ターゲットの単糖を D-erythrose として選択を行ったところ、15種類のペプチドが選択され、その中の10種類にモチーフとして、Trp-Neg-Neg-Neg-Phe/Tyr (Neg で示した3つの残基のうち2つが Asp または Glu) が見いだされた。

選択されたペプチドの特異的認識を確認するため、Trp-Ala-Asp-Glu-Phe と Trp-Gly-Asp-Glu-Tyr の2種類のペプチド作製し、Trp の蛍光強度によって単糖との相互作用を解析した。その結果、理論曲線と実験データは精度よく一致し、1:1 でペプチドと糖が結合していることが示された。2つのモチーフペプチドとターゲットの D-erythrose との結合定数はそれぞれ 3.5×10^5 , $2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。対照として算出したモチーフペプチドと D-Gal との結合定数は 10^4 M^{-1} 程度であることから、モチーフペプチドは D-erythrose を特異的に認識できることが示された。また、モチーフペプチドと D-erythrose との複合体の結合エネルギーは $-7.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ であったのに対し、対照ペプチドの S_{i+4} と D-erythrose の結合の場合は $-4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、その差は $2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。この値は、生体内での平均的な水素結合の自由エネルギーと対応している。よってこれらの解析から、モチーフペプチドが D-erythrose を CH- π 相互作用と水素結合の両者によって特異的に認識していることが示された⁵⁹⁾。

おわりに

生命分子の相互作用の本質を探る手法として、empirical なダウンサイジング法と *ab initio* 的コンビナトリアルケミストリー法を紹介した。お気づきのうちにこれらの手法で得られた機能性分子は、水素結合とスタッキング相互作用によってその機能を発現していた。すなわち、これらの相互作用 (静電相互作用と疎水性相互作用を含めて) を case by case (核酸、蛋白質、糖、脂質などの組み合わせ) で定量化しデータベース化することによって、ゲノム計画やプロテオーム計画とは一味違った、機能性分子の開発のガイドラインが得られるかもしれない。

本文で紹介した我々の研究成果は、筆者の研究室の三好大輔、奥本泰秀、大道達雄、中野修一、数田英輝、岡部慎司の諸氏の卓越したアイデアと熱心な実験によるところ大である。心から感謝したい。また、研究遂行上、文部省科学研究費補助金および日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業研究プロジェクト「新機能人工核酸の化学的創出」の補助を受けたことを記し、感謝の意を表します。

(2000年5月25日受理)

文 献

- 1) T. R. Cech, A. J. Zang, P. J. Grabowski, *Cell*, **27**, 553 (1981)
- 2) H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature*, **372**, 68 (1994)
- 3) W. G. Scott, J. T. Finch, A. Klug, *Cell*, **81**, 991 (1995)
- 4) S. Amontov, K. Taira, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1624 (1996)
- 5) T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Biochemistry*, **31**, 3887 (1992)
- 6) T. Pan, O. C. Uhlenbeck, *Nature*, **358**, 560 (1992)
- 7) N. Sugimoto, T. Ohmichi, *FEBS Lett.*, **393**, 97 (1996)
- 8) T. Ohmichi, N. Sugimoto, *Biochemistry*, **36**, 3514 (1997)
- 9) T. Ohmichi, N. Sugimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2743 (1997)
- 10) R. R. Breaker, *Nature Biotechnology*, **15**, 427 (1997)
- 11) B. Cuenoud, J. W. Szostack, *Nature*, **375**, 611 (1995)
- 12) N. Sugimoto, N. Wakizaka, *Nucleosides & Nucleotides*, **17**, 565 (1997)
- 13) Y. Li, D. Sen, *Nature Structural Biology*, **3**, 743 (1996)
- 14) Y. Li, D. Sen, *Biochemistry*, **36**, 5589 (1997)
- 15) A. Cochran, P. G. Schullz, *Science*, **249**, 781 (1990)
- 16) P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science*, **269**, 1835 (1995)
- 17) N. Sugimoto, T. Toda, T. Ohmichi, *Chem. Commun.*, **1998**, 1533
- 18) R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. & Biol.*, **1**, 223 (1994)
- 19) N. Carmi, S. R. Balkhin, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2233 (1998)
- 20) N. Sugimoto, Y. Okumoto, T. Ohmichi, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 5655 (1998)
- 21) W. G. Scott, J. B. Murray, J. R. P. Arnold, B. L. Stoddard, A. Klug, *Science*, **274**, 2065 (1996)
- 22) J. H. Cata, R. L. Hanna, J. A. Dou, *Nature Structural Biology*, **4**, 553 (1997)
- 23) N. Sugimoto, Y. Okumoto, T. Ohmichi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1999**, 1381
- 24) N. Sugimoto, Y. Okumoto, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **42**, 281

- (1999)
- 25) Y. Okumoto, N. Sugimoto, *J. Inorg. Biochem.*, in press (2000)
 - 26) 杉本直己, 大道達雄, *化学*, **54**, 49(1999)
 - 27) 杉本直己, 奥本泰秀, *材料科学*, **36**, 71(1999)
 - 28) S. Raghunathan, C. S. Ricard, T. M. Lohman, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6652(1997)
 - 29) S. C. Kowalczykowski, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **20**, 539(1991)
 - 30) C. M. Radding, *J. Biol. Chem.*, **266**, 5355(1991)
 - 31) R. M. Story, I. T. Weber, T. A. Steitz, *Nature*, **355**, 318(1992)
 - 32) R. M. Story, T. A. Steitz, *Nature*, **355**, 374(1992)
 - 33) S. Karlin, L. Brocchieri, *J. Bacteriol.*, **178**, 1881(1996)
 - 34) R. M. Story, D. K. Bishop, N. Kleckner, T. A. Steitz, *Science*, **259**, 1892(1993)
 - 35) M. Skiba, K. L. Knight, *J. Biol. Chem.*, **269**, 3823(1994)
 - 36) K. M. Logan, M. C. Skiba, S. Eldin, K. L. Knight, *J. Mol. Biol.*, **266**, 306(1997)
 - 37) S. Nakano, N. Sugimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 2205(1998)
 - 38) N. Sugimoto, S. Nakano, *Chem. Commun.*, **1997**, 2125
 - 39) I. M. Chaiken, K. D. Janda, "Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry", ACS, Washington, DC, 1996. "コンビナトリアルケミストリー", コンビナトリアルケミストリー研究会編, 化学同人, 1997
 - 40) N. Sugimoto, H. Kazuta, J. Zou, D. Miyoshi, *Chem. Commun.*, **1999**, 677
 - 41) P. N. Lewis, F. A. Momany, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2293(1971)
 - 42) I. D. Kuntz, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4009(1972)
 - 43) P. Y. Chou, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **13**, 222(1974)
 - 44) C. M. Venkatachalam, *Biopolymers*, **6**, 1425(1968)
 - 45) T. Yamada, M. Nakao, T. Miyazawa, S. Kuwata, M. Sugiura, Y. In, T. Ishida, *Biopolymers*, **33**, 813(1993)
 - 46) N. Sugimoto, S. Nakano, *Chem. Lett.*, **1997**, 939
 - 47) J. Kawakami, T. Kitano, N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, **1999**, 1765
 - 48) J. K. James, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3287(1993)
 - 49) N. Sugimoto, S. Okabe, M. Yoneyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **42**, 179(1999)
 - 50) B. A. Fenderson, G. K. Ostrander, Z. Hausken, N. S. Radin, S. Hakomori, *Exp. Cell. Res.*, **198**, 362(1992)
 - 51) S. Ichikawa, N. Nakajo, H. Sakiyama, Y. Hirabayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2703(1994)
 - 52) U. V. Santer, D. DeSantis, K. J. Hard, J. A. van Kuik, J. F. Vliegthart, B. Won, M. C. Glick, *Eur. J. Biochem.*, **181**, 249(1989)
 - 53) J. Othuka, K. Kobayashi, H. Toi, Y. Aoyama, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 1945(1993)
 - 54) T. Takagi, A. Tanaka, S. Mutou, H. Maezaki, M. Tani, H. Fujiwara, Y. Sasaki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1987**, 1015
 - 55) K. Drickamer, *Nature*, **360**, 183(1992)
 - 56) R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, **96**, 683(1996)
 - 57) Y. Bourne, H. van Tilbeurgh, C. Cambillau, *Current Opinion in Struct. Biol.*, **3**, 681(1993)
 - 58) E. J. Cantor, E. D. Atkins, S. J. Cooper, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *J. Biochem(Tokyo)*, **122**, 217(1997)
 - 59) N. Sugimoto, D. Miyoshi, J. Zou, *Chem. Commun.*, in press (2000)

PROFILE

杉本直己 甲南大学理学部化学教室教授 理学博士；ハイテクリサーチセンター・プロジェクト代表
 [経歴] 1979 年京都大学理学部卒, 1985 年同学大学院理学研究科博士後期課程修了, 同年米国ロチェスター大学博士研究員, 1988 年甲南大学理学部講師, 1991 年助教授, 1994 年より教授, 1999 年よりハイテクリサーチセンター・プロジェクト代表併任。[専門] 生命分子化学