

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008~2011

課題番号：20241051

研究課題名 (和文) モジュール設計による機能性 RNA-タンパク質複合体創製原理の確立

研究課題名 (英文) Modular strategy to construct functional ribonucleopeptides

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

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体高分子、核酸・タンパク質、生体認識・機能化学、モジュール、センサー、分子認識、ケミカルバイオロジー、RNA

1. 研究計画の概要

(1) RNA モジュール構造をもとにしたセンシング RNP の構築

① 申請者らが開発した ATP 結合性 RNP センサーの RNA 二次構造を系統的に解析し、特定の蛍光分子の蛍光強度の変化に特異的に寄与する二次構造モジュール (蛍光モジュール) を同定する。

② 同定された蛍光モジュールを既知の RNA アプタマーに導入してセンサー化し、蛍光モジュールの汎用性を検証する。

(2) ATP 結合性 RNP センサーの三次元構造解析

① ATP に対する蛍光 RNP センサーの三次元構造を NMR により解析する。ATP 結合性 RNP センサー (RNP16) は 16 ヌクレオチドからなる ATP 結合領域を持ち、ATP との結合により、7-メチルクマリンの蛍光強度は 4.5 倍に増大する。¹³C および ¹⁵N でラベルした RNP16 を用いることにより、三次元構造を解析する。

② RNP16 の三次元構造解析結果をもとにして、ATP 認識と蛍光発光機構を明らかにするとともに合目的な RNP リセプター・センサーの機能設計原理を確立する。

(3) ヘテロな分子認識モジュール構造を持つ RNP リセプターの構築

二つの特徴的な構造エレメントを持つ基質を標的とし、二段階で RNP リセプターを構築する方法論を確立する。

① アデノシン骨格を認識する RNP リセプターの RNA サブユニットとペプチドサブユニットをファージディスプレイ法でライ

ブライ化することにより、ペプチドサブユニットでフラビンモノヌクレオチド (FMN) 骨格を認識する RNP を構築する。

② ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドを用いて、段階的な RNP リセプター構築法の有効性を実証する。

(4) ペプチドモジュールの反応活性点をもとにした RNP 触媒の構築

金属イオンが配位可能な合成ペプチドモジュールを、活性中心として用いた触媒反応場を構築する。

① C2H2 型亜鉛フィンガーおよびその変異体を、ペプチドサブユニット N 末端に導入した水分子が亜鉛イオンに配位できる構造モジュールを有する Rev ペプチドサブユニットと RNA ライブラリーを結合させて RNP ライブラリーを作製し、エステル加水分解触媒構築法を検討する。

② アミド結合の加水分解遷移状態アナログを合成し、①と同様に RNP ライブラリーに対するインビトロセクションにより触媒機能を持つ RNP を得る。

(5) RNA タンパク質複合体の段階的機能化による RNP 酵素の構築

RNP の段階的機能化法により、エステル結合を加水分解する RNP 酵素の作製を試みる。

ファージディスプレイ法によりライブラリー化したペプチドサブユニットを含む RNP ライブラリーからエステルの加水分解遷移状態アナログに結合する RNP を単離し、その酵素活性を検証する。

(6) 細胞内に導入可能な機能性 RNP 複合

体の構築

① 酸化した RNA 末端をペプチドサブユニットに導入したヒドラジド基で化学修飾することにより安定な RNP を構築し、その細胞内での利用を検討する。

② RNP リセプターの RNA サブユニットを細胞内で発現させ、ペプチドサブユニットを細胞外液より導入し、細胞内でのリセプター・センサーの機能を検証する。

2. 研究の進捗状況

(1) RNA モジュール構造をもとにしたセンシング RNP の構築

ATP 結合性 RNP の RNA 二次構造を系統的に解析し、ATP の結合に伴って蛍光分子の蛍光強度の変化に寄与する二次構造 (蛍光モジュール) を同定した。この蛍光モジュールを既知の GTP 結合性 RNA アプタマーに導入することにより、GTP アプタマーをもとにして蛍光 GTP センサーを構築した。

(2) ATP 結合性 RNP センサーの三次元構造解析

16 ヌクレオチドからなる ATP 結合領域を持つ RNP16 を ¹³C および ¹⁵N でラベルし、NMR により構造決定及び U:Ado:U トリプレットの形成による ATP 認識様式を明らかにした。また、酵素、ジメチル硫酸を用いた構造マッピングにより、ATP 複合体形成に伴う三次元構造変化を明らかにした。

(3) RNA タンパク質複合体の段階的機能化による RNP 酵素の構築

RNP の段階的機能化法により、エステル結合を加水分解する RNP 酵素の作製を試みた。

RNA サブユニットに基質 ATP 結合場を作製した。RNP を形成するペプチドとして、Rev ペプチドの N 末端に C2H2 型 Zn フィンガーを有する亜鉛イオン配位型ペプチド Zif-Rev を設計・合成した。得られた Zif-Rev は ATP 結合性 RNP の RNA サブユニットと安定な複合体を形成することが明らかになった。また、エステル加水分解触媒能をもたせるため、Zif-Rev のヒスチジンをアラニン、セリン、アスパラギン酸に変異させた誘導体を合成した。

(4) 細胞内に導入可能な機能性 RNP 複合体の構築

非共有結合型 RNA-ペプチド複合体 (RNP) をもとにして、RNA サブユニットとペプチドサブユニットを共有結合で安定化した cRNP を作製した。過ヨード酸で酸化した RNA 末端をペプチドサブユニットに導入したヒドラジド基で化学修飾することにより安定な RNP を構築し、その細胞内抽出液中での安定性を評価したところ、2 時間後でも当初の 80% 以上の蛍光センサー活性を示すことが明らかになった。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

当初計画した 5 つの研究項目 (「研究計画の概要」を参照) のうち、(1) および (2) について期待した研究成果をあげることができ、それらについて論文を発表もしくは投稿中である。また、(4) および (6) の研究項目についても順調な研究成果を得ている。

4. 今後の研究の推進方策

「研究計画の概要」にある研究項目 (3) および (5) については平成 23 年度以降重点的に研究を進める。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件 全て査読有)

- ① Nakano, S., Mashima, T., Matsugami, A., Inoue, M., Katahira, M., Morii, T. "Structural Aspects for the Recognition of ATP by Ribonucleopeptide Receptors." *J. Am. Chem. Soc.* 133, 4567-79, 2011.
- ② Hasegawa, T., Hagiwara, M., Fukuda, M., Nakano, S., Fujieda, N., and Morii, T. Context-dependent fluorescence detection of a phosphorylated tyrosine residue by a ribonucleopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8804-8812, 2008.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Takashi Morii, "Molecular Recognition by Ribonucleopeptides." Pacificchem 2010, 2010.12.19, Hawaii.
- ② Takashi Morii, "A modular strategy for tailoring functional ribonucleopeptide complexes." 2nd Switzerland-Japan Biomolecular Chemistry Symposium, 2009.9.11, Tokyo.

[図書] (計 1 件)

- ① Nakata, E., Liew, F.-F., Nakano, S. and Morii, T. Recent progress in the construction methodology of fluorescent biosensors based on biomolecules." in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, InTech 2011.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
なし
- 取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]