

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31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） A modular strategy to construct functional RNA-protein complexes

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

研究成果の概要（和文）：

RNA-ペプチド複合体（RNP）の各サブユニットに「機能性モジュール構造」を導入して、蛍光 RNP センサー、RNP 酵素などの機能性 RNA-タンパク質複合体設計原理の確立を目的として研究を実施した。四年間の研究により、

- (1) RNP モジュール構造をもとにした蛍光 RNP センサーの合理的な構築法
- (2) ATP 結合性 RNP センサーの三次元構造解析
- (3) ATP 結合性 RNP の ATP 認識様式の解明
- (4) 細胞抽出液中で使用可能な機能性 RNP 複合体の構築

に成功し、機能性 RNP 構築原理に関する重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

A stable complex of a peptide and RNA, ribonucleopeptide (RNP), provides a new framework to construct a macromolecular receptor for small molecules. The RRE RNA and the Rev peptide form a structurally well-characterized stable RNP complex that is suitable for a stepwise functionalization. In vitro selection of the RNP pool originating from an RRE-based RNA library and the Rev peptide affords RNP receptors specific for nucleotide triphosphates, for a phosphotyrosine residue in defined amino acid sequence, and for dopamine. A new ATP-binding motif for the ATP-binding RNP was characterized by a combination of biochemical and NMR studies. The RNP receptor functionalized by a fluorophore-labeled Rev peptide exerts optical signals associated with the ligand binding events. Replacing the Rev peptide of the ATP-binding RNP with a fluorophore-modified Rev peptide affords a series of fluorescent ATP sensors. This strategy to generate tailor-made fluorescent sensors is applied for a selective detection of a specific phosphorylated tyrosine residue within a defined amino acid sequence.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費       | 合計         |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 12,300,000 | 3,690,000  | 15,990,000 |
| 2009年度 | 8,500,000  | 2,550,000  | 11,050,000 |
| 2010年度 | 8,500,000  | 2,550,000  | 11,050,000 |
| 2011年度 | 8,700,000  | 2,610,000  | 11,310,000 |
| 総計     | 38,000,000 | 11,400,000 | 49,400,000 |

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：RNA、ペプチド、インビトロセレクション、リセプター、センサー、分子認識

## 1. 研究開始当初の背景

生体高分子を用いた機能性分子設計 化学合成技術、遺伝子工学技術そして構造生物学の急速な進歩により、タンパク質もしくは核酸 (RNA および DNA) 単体の機能改変が積極的に研究されている。アミノ酸 (ヌクレオチド) 変異、進化工学的手法 (ファージディスプレイ法、抗体触媒法、インビトロセクション法など)、そして三次元構造をもとにした分子設計法などによる機能性生体高分子の作製は一定の成功を収めてきたが、いまだに天然の酵素に匹敵する性能をもつ抗体触媒やリボザイムを得る方法論は確立されていない。

### RNA-タンパク質複合体を用いた機能性分子設計

リボソームに代表される、極めて高い情報認識・酵素反応機能を持つ RNA-タンパク質複合体の三次元構造が次々と明らかにされたことにより、これまでに蓄積されたタンパク質および RNA 単体の科学をもとにして、「生体高分子複合体の機能を分子レベルで開拓・創製する科学」を展開できる時機が到来した。RNA とタンパク質それぞれが持つ化学的特質を活かし、複数の生体高分子サブユニットを協同的作用が発揮出来るように立体的に配置させれば、RNA-タンパク質複合体は RNA もしくはタンパク質単体よりも高い分子認識能と化学反応性を示すことが期待できる。

### 機能性 RNA-ペプチド複合体 (リボヌクレオペプチド、RNP) の構築

申請者らはこれまでに、(1) 立体構造が明らかでない RNA-ペプチド複合体 (Rev-RRE 複合体) の RNA サブユニットに Szostak らが開発したインビトロセクション法を適用することにより、リボヌクレオペプチド (RNP) リセプターが構築 (*J. Am. Chem. Soc.* **2002** など)、(2) RNP リセプターのペプチドサブユニットにファージディスプレイ法を適用した RNP ライブラリーから、分子識別能が向上した RNP リセプターを選出 (*J. Am. Chem. Soc.* **2005**)、(3) ペプチドサブユニットに蛍光分子を導入することで、分子認識能を低下させることなく RNP リセプターを蛍光性センサーに変換できる (*J. Am. Chem. Soc.* **2006**) ことを実証した。

これらの結果から、RNA-ペプチド複合体の RNA サブユニットとペプチドサブユニットそれぞれに、進化工学的手法 (インビトロセクション法およびファージディスプレイ法) を適用して高機能リセプターが構築できることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

本研究では、RNA-ペプチド複合体 (RNP)

の各サブユニットに「機能性モジュール構造」を導入して、蛍光 RNP センサーと RNP 酵素を設計・作製する合目的な方法論を確立する。このために、RNP 複合体を用いた分子設計の利点である RNA サブユニットとペプチドサブユニットを段階的に機能化する方法を汎用性のある方法論として発展させる。また、細胞内で利用できる機能性 RNP を開発することにより強力なケミカルバイオロジーのツールとなると期待される。研究期間中に以下の研究項目を実施し、機能性 RNA-タンパク質複合体設計原理を確立することを目的とした。

(1) RNA モジュール構造をもとにしたセンシング RNP の構築

(2) ATP 結合性 RNP センサーの三次元構造解析

(3) ヘテロな分子認識モジュール構造をもつ RNP リセプターの構築

(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

(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

(6) 細胞内に導入可能な機能性 RNP 複合体の構築

## 3. 研究の方法

### (1) RNA モジュール構造をもとにしたセンシング RNP の構築

申請者らが開発した ATP 結合性 RNP センサー (*J. Am. Chem. Soc.*, **2006**) の中で、ATP 結合に伴う蛍光強度変化が大きい RNP センサーの RNA 二次構造を系統的に解析し、ATP 結合部位以外の特徴的な二次構造モジュールを抽出する。それぞれの二次構造モジュールを蛍光強度変化の小さい RNP センサーに導入することにより機能評価し、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。

同定した蛍光モジュールをこれまでに作製された RNA アプタマーに導入し、それらの基質結合に伴う蛍光強度変化を計測する。これにより、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

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。7-メチルクマリンを蛍光分子として有する 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 (CGUAGUGGUGUGUGUGUG) を持ち、解離定数 940 nM で ATP と結合する。また、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。RNP16 リセプターは、ATP 存在下においても明瞭なイミノプロトンシグナルを与えるため、<sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N でラベルした RNP16 を用いることにより、三次元構造が解析できる可能性は高い。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。

### (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

特徴的な構造骨格を二つ持つ分子を標的として、それぞれの骨格を RNA で構成される分子認識面とペプチドで構成される分子認識面で認識する、高い分子識別能を持つ RNP リセプター構築法を確立する。

二つの特徴的な構造エレメントを持つ基質フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 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。

ステップ1として、インビトロセクション法により RNA サブユニットでアデノシン骨格 (Ado) を認識する RNP リセプターを構築する。ステップ2では、ステップ1で得られた RNA サブユニットを用いて、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リー化することにより、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。ステップ2でペプチドサブユニットにフラビン結合部位を作製する際に、RNA サブユニット中に作製したアデノシン結合部位との立体的な位置関係が最適化できるインビトロセクション法を開発する。これにより、FAD の特徴的な二つの構造エレメントを RNA サブユニットとペプチドサブユニットで認識する RNP リセプターを構築する。

同じく二つの特徴的な構造エレメントを持つニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 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

合成ペプチドモジュールにあらかじめ作製した金属イオン活性中心にあつらえた基質認識場を RNA サブユニットにより作製し、人工的な触媒反応場を構築する。亜鉛イオンに配位する天然タンパク質モジュールとして C2H2 型亜鉛フィンガーを、三次元構造をもとにした分子設計によりペプチドサブユニット N 末端に導入する。ここで、C2H2 型亜鉛フィンガーのうち C 末端に位置するヒスチジンをグリシンへと変異させることにより、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を作製する。

亜鉛イオン結合モジュールを導入した Rev

ペプチドと RNA ライブラリーを結合させて RNP ライブラリーを作製し、ニトロフェノールエステルを有する基質の加水分解反応を検討する。また、研究 (3) で開発した位置を規制した結合場の作製法を用いた触媒構築法も検討する。

### (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

従来の抗体触媒のように反応遷移状態アナログだけに強い親和性を示すのではなく、出発物質にも親和性を示し、生成物には結合しない 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。その知見を利用してリン酸化チロシンを含むアミノ酸配列中のペプチド結合を加水分解する RNP 酵素を作製する。

### (6) 細胞内に導入可能な機能性 RNP 複合体の構築

ペプチドサブユニットが細胞膜透過性を持つことを利用し、蛍光性 RNP センサーを共有結合による安定化、もしくは細胞内での RNA サブユニット発現により、細胞内での RNP センサーの機能を評価する。

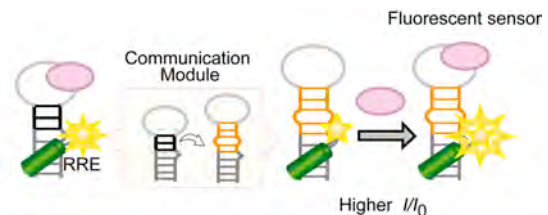
## 4. 研究成果

機能性 RNA-タンパク質複合体設計原理を確立する事を目的とした研究項目を実施し、以下の成果を得た。

### (1) RNA モジュール構造をもとにしたセンシング RNP の構築

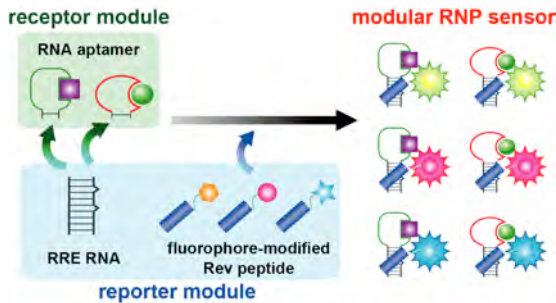
ATP 結合性 RNP センサーの中で、ATP 結合に伴う蛍光強度変化が大きい RNP センサーの RNA 二次構造を解析し、ATP 結合部位とペプチド結合部位の間に特徴的な RNA 二次構造モジュールを発見した。この RNA 二次構造モジュールを蛍光性 RNP センサーに導入して機能解析を行った結果、この二次構造モジュールはペプチドサブユニット N 末端に存在する蛍光分子の蛍光強度変化に寄与する二次構造モジュールであることが明らかになった (図 1) (文献 3)。

この RNA 二次構造モジュールを利用することにより、既知の RNA アプタマーを効率よく蛍光センサーへと変換することが可能になる。



(図 1)

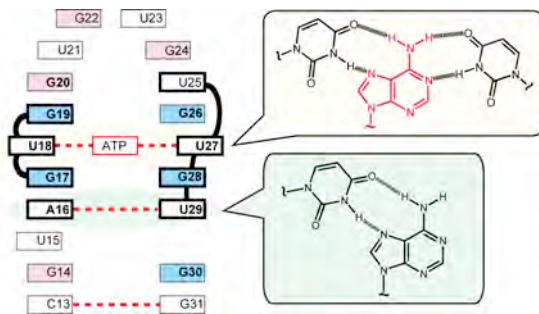
そこで、RNP 蛍光モジュールを GTP 結合性 RNA アプタマーに導入し、それらの GTP 結合に伴う蛍光強度変化を確認した（文献 5）。この結果により、RNP 蛍光モジュールを RNA アプタマーと融合することにより、蛍光 RNP センサーが構築できることが明らかになった（図 2）。



(図 2)

## (2) ATP 結合性 RNP センサーの三次元構造解析

ATP 結合性 RNP センサー (RNP16) をもとにして、<sup>13</sup>C および <sup>15</sup>N でラベルした RNP16 を合成して NMR による三次元構造が解析を行った結果、RNP 中の二つの U 塩基と基質アデノシンが U:A:U トリプレットを形成して結合することが明らかになった（図 3）。



(図 3)

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考察した。その結果、コンセンサス配列間に存在する RNA 配列が蛍光分子の消光に関与していることが明らかになった（文献 6）。

## (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ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) を用いて、段階的な RNP リセプター構築法の有効性を検討した。

RNP ライブラリーをもとにしたインビトロセレクトの結果、アデノシン部位に対して高い選択性・親和性を有する RNP を作製す

ることは出来たが、ニコチンアミド部位に対する選択性を付与するにはいたっていない。

## (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

Rev ペプチドサブユニットに Zn フィンガーモチーフをもとにした亜鉛イオン配位子を導入した。Zn フィンガー-Rev ペプチドを合成し、亜鉛イオンの配位結合を評価した。

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。エステル (ペプチド) 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。

また、Rev ペプチドの N 末端にエチレンジアミン基を導入したペプチドサブユニットを合成した。

反応基質としてアデノシンの 5'-OH 基にリンカーを介してニトロフェノールエステル導入した分子を合成した。

RNA サブユニットには ATP 結合性 RNP の RNA を利用した。ATP 結合性 RNP の RNA サブユニット群と Zif-Rev、そしてエチレンジアミン修飾 Rev を用いた RNP ライブラリーを構築し、アデノシンを認識骨格として有するニトロフェノールエステル加水分解活性を有する RNP を探索している。

## (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

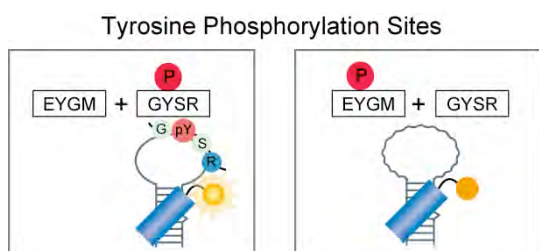
RNP の段階的機能化により、ペプチド結合を加水分解する RNP 酵素の作製を試みた。

そのために、リン酸化チロシンだけでなく、その周辺のアミノ酸配列も高選択的に認識できる RNP リセプターを作製し、さらに、RNP リセプターをもとにして蛍光性 RNP センサーを構築した。天然タンパク質中に見られるリン酸化チロシンを含有するアミノ酸配列 (Gly-pTyr-Ser-Arg) に対して *in vitro* セレクション法を利用して RNP リセプターを作製した。作製された RNP リセプターは、リン酸化チロシンを含むテトラペプチド Gly-pTyr-Ser-Arg に対して、リン酸化チロシンの芳香環とリン酸基を高選択的に認識するだけでなく、リン酸化チロシン周辺のアミノ酸配列をも認識する人工リセプターであった。

得られた Gly-pTyr-Ser-Arg 配列に対する RNP リセプターをもとにして、RNP リセプターのペプチド N 末端に蛍光分子を導入することにより、RNP リセプターの三次元構造情報



がなくとも蛍光センサーが構築できることを示した。励起波長が 350 nm から 650 nm である蛍光分子を用いて、蛍光ペプチドライブラリーを構築した。RNA ライブラリーと蛍光ペプチドライブラリーを組み合わせた網羅的なスクリーニングによって、Gly-pTyr-Ser-Arg 配列に対する蛍光センサーの構築に成功した。得られた蛍光センサーは、もとの RNP リセプターと同じく、リン酸化チロシンを含む Gly-pTyr-Ser-Arg 配列に対して、高い選択性と親和性を示した (文献 10) (図 4)。

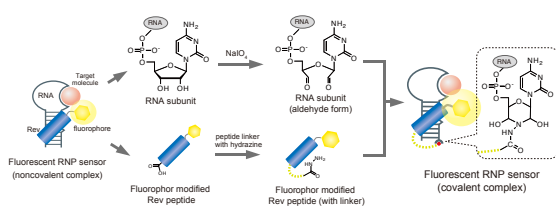


(図 4)

今後、このアミノ酸配列特異的にリン酸化チロシン残基を認識する RNP を用いて、段階的にペプチド結合加水分解酵素を作製する。

#### (6) 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細胞抽出液中で使用可能な機能性 RNP 複合体 (cRNP) を構築した。RNA-ペプチド複合体 (RNP) 中の、3'-末端を過ヨード酸で酸化した RNA とペプチドの C 末端に導入したヒドラジド基とを反応させることにより、共有結合により安定化した cRNP を構築した (図 5)。



(図 5)

この手法は、ペプチド N 末端に蛍光分子を導入した場合にも用いることが出来た。蛍光色素を導入した cRNP 蛍光センサーの HeLa 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。共有結合化した ATP 結合性 RNP センサーは細胞抽出液中での利用が可能であった。また、GTP 結合性 RNP センサーの共有結合体を合成し、そ

れらによって細胞抽出液中で ATP および GTP センシングが可能であることを実証した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 37 件) (※主要論文のみ記載)

1. T. Morii\* et al., "Positional effects of phosphorylation on the stability and morphology of tau-related amyloid fibrils", *Biochemistry*, Vol.51, No.7, 1396-1406, 2012. (DOI: 10.1021/bi201451z)
2. T. Morii\* et al., "Zinc-Finger Proteins for Site-Specific Protein Positioning on DNA-Origami Structures", *Angew Chem. Int. Ed.*, Vol.51, No.10, pp.2421-2424, 2012. (DOI: 10.1002/anie.201108199)
3. T. Morii\* et al., "A ribonucleopeptide module for effective conversion of an RNA aptamer to a fluorescent sensor", *Bioorg. Med. Chem.*, Vol.19, No.19, pp.5771-5775, 2011. (DOI: 10.1016/j.bmc.2011.08.031)
4. T. Morii\* et al., "Construction of Dopamine Sensors by Using Fluorescent Ribonucleopeptide Complexes", *Bioorg. Med. Chem.*, Vol.19, No.15, pp.4473-4481, 2011. (DOI: 10.1016/j.bmc.2011.06.031)
5. T. Morii\* et al., "Facile conversion of RNA aptamers to modular fluorescent sensors with tunable detection wavelengths", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol.21, No.15, pp.4503-4506, 2011. (DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.05.120)
6. T. Morii\* et al., "Structural Aspects for the Recognition of ATP by Ribonucleopeptide Receptors", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol.133, pp.4567-4579, 2011. (DOI:10.1021/ja110725d)
7. T. Morii\* et al., "An in vitro fluorescent sensor reveals intracellular Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> dynamics in single cells", *Angew Chem. Int. Ed.*, Vol.49, pp.2150-2153, 2010. (DOI:10.1002/anie.200903951)
8. T. Morii\* et al., "A Single Circularly Permuted GFP Sensor for Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate Based on a Split PH Domain.", *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 17, pp.7381-7386, 2009. (DOI:10.1016/j.bmc.2009.08.015)
9. T. Morii\* et al., "Charge-Pairing Mechanism of Phosphorylation Effect upon Amyloid Fibrillation of Human Tau Core Peptide", *Biochemistry*, Vol. 47, pp.11847-11857, 2008. (DOI:10.1021/bi8010994)
10. T. Morii\* et al., "Context-dependent fluorescence detection of a phosphorylated tyrosine residue by a ribonucleopeptide." *J. Am. Chem. Soc.*,

Vol.130, pp.8804-8812, 2008.  
(DOI:10.1021/ja801734f)

[学会発表] (全 86 件)(内、招待講演 18 件)(※  
国際主要発表のみ記載)

1. (invite) T. Morii, Modular Functionalization of Ribonucleopeptide Assemblies, School of Physical & Mathematical Sciences, 2011.4.13., Singapore
2. (invite) T. Morii, A Modular Strategy for Assembling Receptors and Sensors from Ribonucleopeptides, 2nd Asian 3 Round Table on Nucleic Acids, 2011.10.15., China
3. (invite) T. Morii, Assembling functional protein-nucleic acids complexes, Dongguk University, 2012.3.16, Korea
4. (invite) T. Morii, Molecular Recognition by Ribonucleopeptides, Pacificchem 2010, 2010.12.19, Hawaii
5. (invite) T. Morii, A Modular Strategy for Tailoring Fluorescent Biosensors from Ribonucleopeptides, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids, 2010.10.29., 大阪
6. (invite) T. Morii, Selective Detection of Cellular Signaling Molecules., 1st Asian Chemical Biology Conference, 2010.6.27., Korea
7. (invite) T. Morii, Chemical approaches untangling dynamics of cellular signaling molecules, Kyoto-Oxford Univ. Collaborative Forum, 2010.2.5., U.K.
8. (invite) T. Morii, A Modular Strategy for Tailoring Fluorescent Sensors From Ribonucleopeptides, 3rd Asia-Pacific Int. Peptide Sympo., 2009.11.8.-11., Korea
9. (invite) T. Morii, A Modular Strategy for Tailoring Functional Ribonucleopeptide Complexes, 2nd Swiss-Japan Biomolecular Chemistry Symposium 2009, 2009.9.11-12., 東京
10. (invite) T. Morii, Design of Ribonucleopeptide-based Receptors and Fluorescent Sensors, The IUMRS International Conference in Asia 2008, 2008.12.9-13., 名古屋
11. (invite) T. Morii, A Modular Strategy for Tailoring Ribonucleopeptide-based Fluorescent Sensor, Int. Sympo. on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, 2008.9.18., 京都

[図書] (計 2 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

発明者: 森井 孝, 中田栄司, 松本桂彦

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-244709

出願年月日: 平成 23 年 11 月 8 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

[http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/material/a-12\\_j.html](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 (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

(2) 研究分担者

田井中一貴 (TAINAKA KAZUKI)

京都大学・エネルギー理工学研究所・助教

研究者番号: 80506113