

RNA - ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製

福田 将虎

RNA - ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製

福田 将虎

目次

第一章 序論

1-1	研究背景	1
1-1-1	生体高分子を用いた機能性分子の作製方法	2
1-1-2	生体高分子を用いたテーラーメイドバイオセンサーの構築方法	7
1-1-3	触媒活性を有する RNA 分子と高機能な RNA-タンパク質複合体	8
1-2	RNA-ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製	10
	引用文献	12

第二章 RNA-ペプチド複合体リセプターの段階的高機能化法の開発

2-1	RNA-ペプチド複合体を用いた段階的高機能化法	17
2-1-1	ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法	19
2-2	RNA サブユニットの機能化による ATP 結合性 RNP リセプターの構築 (第一段階機能化)	21
2-2-1	三次元構造に基づいた RNP ライブラリーの分子設計	21
2-2-2	in vitro セレクション法を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択	24
2-2-3	第一段階機能化により得られた RNP リセプターの評価	27
2-3	ペプチドサブユニットの機能化による ATP 結合性 RNP リセプターの 高機能化 (第二段階機能化)	29
2-3-1	ファージディスプレイ法を用いたペプチドライブラリーの作製	29
2-3-2	ファージディスプレイ法を用いたバイオパンニングによる ATP 結合性 RNP リセプターの選択	30
2-3-3	バイオパンニングにより選択された LpRev ペプチドの評価	33
2-4	第二段階機能化により得られた ATP 結合性 RNP リセプターの機能評価	35
2-4-1	ゲルシフト法による RNA33 と LpRev19 の複合体形成確認	35

2-4-2	RNP33/LpRev19 の溶液中の ATP に対する結合試験	35
2-4-3	RNP33/LpRev19 の基質選択性評価 (ATP vs AMP)	38
2-4-4	RNP33/LpRev19 の基質選択性評価 (ATP vs dATP)	38
2-4-5	RNP33/LpRev19 の基質選択性評価まとめ	40
	考察	41
	結論	43
	実験の部	44
	引用文献	56

第三章 RNA - ペプチド複合体を用いたテララーメイドバイオセンサーの構築

3-1	蛍光性リボヌクレオペプチド複合体センサー (蛍光 RNP センサー) の構築	57
3-2	ATP 応答性蛍光 RNP センサーの構築	57
3-2-1	in vitro セレクション法を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択	59
3-2-2	ATP 結合性 RNP リセプターから ATP 応答性蛍光 RNP センサー への機能改変	61
3-3	蛍光性 RNP ライブラリーを用いた ATP 応答性蛍光 RNP センサー のスクリーニング	66
3-3-1	ATP 結合性蛍光 RNP ライブラリーの作製	67
3-3-2	リンカー分子導入による蛍光性 RNP ライブラリーの拡張	74
3-3-3	幅広い ATP 濃度レンジで応答する蛍光 RNP センサー のスクリーニング	76
3-4	GTP 応答性蛍光 RNP センサーの構築	78
3-4-1	in vitro セレクション法を用いた GTP 結合性 RNP リセプターの選択	78
3-4-2	GTP 結合性 RNP リセプターから GTP 応答性蛍光 RNP センサー への機能改変	80

3-4-3	幅広い GTP 濃度レンジで応答する蛍光 RNP センサー のスクリーニング	79
3-5	蛍光マイクロプレートリーダーを用いた ATP、GTP 応答性蛍光 RNP センサー の塩基選択性評価	84
3-6	蛍光マイクロプレートリーダーを用いた ATP と GTP 共存溶液中の ATP、GTP を異なる波長で検出する方法の検討	85
	考察	89
	結論	91
	実験の部	92
	引用文献	96
第四章	基質結合配向性を制御した RNA-ペプチド複合体リセプターの構築	
4-1	基質の結合配向性を制御した RNP リセプターの構築	99
4-1-1	基質の結合配向性を制御した in vitro セレクション法の開発	100
4-2	ATP 結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターの構築	102
4-2-1	ランダム領域の長さの異なる RNA ライブラリーの作製	102
4-2-2	Nn RNA ライブラリーを用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択	104
4-2-3	選択された ATP 結合性 RNP リセプターの評価	104
4-2-4	N 末端に ATP を化学修飾した Rev ペプチドの合成	107
4-2-5	ATP 修飾 Rev ペプチドを用いた ATP 結合配向性 を制御したセレクション	108
4-2-6	ATP 結合配向性を制御したセレクションにより選択された RNA の塩基配列	110
4-2-7	選択された ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合能評価	111
	考察	113

結論

実験の部

引用文献

第五章 総括

論文目録

学会発表

謝辞

第一章

序論

1-1 研究背景

近代から現代にかけて、人類はエネルギー資源である豊富な石油の巧みな利用により高度化した社会を築き上げてきた。そのような技術の発展がもたらした大量生産、大量消費の社会は豊かな生活を実現してきたが、今日のエネルギー事情は、石油のみならず、石炭や天然ガスも含めたエネルギー資源の枯渇化という大きな問題に直面している。また、このような社会がもたらした環境負荷は、自然破壊、大気汚染、水質汚染などの深刻な環境問題を引き起こした。現在の化石資源を中心としたエネルギー供給体系を見直し、エネルギー・環境問題を改善するためには、環境負荷が少なく、クリーンかつ高効率なエネルギー生産・利用システムの開発が望まれる。その一つとして生物のエネルギーシステムを利用する方法論がある。クリーンで、極めて高いエネルギー利用効率を持つ生物のエネルギーシステムは、酵素をはじめとする生体高分子によって構築されている。酵素は生物が用いている触媒であり、常温・常圧でその機能を発揮し、かつ、容易に生分解されるため、非常に環境負荷の少ない触媒である。これら酵素の長所をあわせもった、社会で必要とされるエネルギー利用にあわせたテラーメイド酵素は、持続可能社会実現に向けてのエネルギー・環境問題を解決する役割を担う機能性生体高分子であると考えられる。

現代社会が直面しているエネルギー・環境問題に対して、環境汚染物質が生命に与える影響や、環境中に存在する環境汚染物質を正確に計測し評価することも非常に重要な課題である。環境汚染分子が生命に及ぼす影響を科学的に解明するためには、生体内の応答様式を解析する技術及び、環境中の微量成分を迅速かつ簡便に計測する技術が必要である。その技術の一つとしてバイオセンサーが挙げられる。バイオセンサーは生体分子が持つ優れた基質認識能を利用または模倣し、標的分子を定量的に検出する化学センサーである。任意の標的分子に対して高選択的かつ高感度に応答するテラーメイドバイオセンサーを作製する一般的な方法論を開発することにより、持続可能社会実現に大きく貢献できる。

1-1-1 生体高分子を用いた機能性分子の作製方法

生物が有するエネルギーシステムを社会で利用するためには、目的とする基質特異性と反応性を有する機能性生体高分子を自在に設計、そして作製する方法論の開発が必要である。機能性生体高分子の一つであるタンパク質酵素は、20種類のアミノ酸により構成される生体高分子であり、生物が生命活動を行う上での様々な重要な働きを担っている。そのアミノ酸配列（一次構造）は直鎖状であるが、 α ヘリックス構造や β シート構造などの二次構造を形成し、さらにそれらが折り畳まって複雑な三次元構造を形成することにより機能を発揮する。天然の酵素の活性は、基質分子の反応中間体（遷移状態）が酵素との結合により安定化され、反応の活性化エネルギーが減少されることで発揮される。また、天然の酵素は、厳密な配向性のもと基質が結合する基質結合場、化学反応場を有し、基質分子の結合または反応に伴い立体構造変化が誘起され、複数のアミノ酸残基が触媒基として協奏的に作用することで高い触媒活性を示していると考えられている。

生体高分子を利用した人工機能性分子を作製する方法論には、天然のタンパク質酵素の三次元立体構造情報をもとに、分子化学的な洞察を組み合わせる部位特異的な変異導入を行い、新たな分子の設計を行う手法（structure-based design）^{1,2}がある。また、エラープローンPCR法³やDNAシャッフリング法⁴を用いて全遺伝子に対して無作為に変異導入するランダム変異法は、三次元構造情報を必要とせず、構造情報からは予測できない変異を見出すことが可能な手法である。さらには、これら二つの手法を組み合わせ、設計できない領域に多様化させたライブラリーを導入し、目的の機能をもった分子を選び出す手法などがある。これらの手法により、天然のタンパク質酵素の基質認識能および安定性の向上、そして活性の改変に一応の成功をみているが⁵、タンパク質酵素の三次元立体構造を制御して設計し、社会で必要とされるエネルギー利用反応にあわせたテラーメイド酵素を作製する方法論には遠く及ばないものである。

近年、ファージディスプレイ法の開発により、高機能なタンパク質や新たな機能を有するポリペプチドなどの機能性生体高分子を作製する手法が開発された⁶。ファージディスプレイ法は1985年にSmithが繊維状ファージの生活環を利用し（図1-1）、ファージ表面にランダムなポリペプチドの提示が可能であることを報告したのを発端に、現在までに目的の機能を有するポリペプチドをスクリーニングする方法として発展した。ファージは細菌に感染するウイルス

であり、大腸菌を宿主とする繊維状ファージ M13 は、環状の一本鎖ゲノム DNA を数種類のコートタンパク質 (g3p、g6p、g7p、g8p、g9p) が包み込んだ形態である。この M13 ファージを用いたファージディスプレイ法は、宿主大腸菌に対する感染能を失わないように、外来ポリペプチドまたはタンパク質をコートタンパク質と融合させた形で発現させ、ファージ表面に提示させる方法である。ファージディスプレイ法の利点は、(1) 一度に 10^7 種以上の分子種を提示したファージライブラリーの作製が可能であること、(2) ファージ 1 粒子につき 1 種類の外来ペプチドが発現しているため、目的とする機能を有したファージの単離が可能であること、(3) ファージには、提示しているペプチドまたはタンパク質をコードしている遺伝子が内包されているため、DNA 配列解析により容易にアミノ酸配列を決定できることが挙げられる。多様化したポリペプチドを提示したファージライブラリーを用いて、目的ポリペプチドをスクリーニングする方法はバイオパンニングとも呼ばれ (図 1-2)、この手法を用いて様々な分子に結合するポリペプチドが単離されている。ファージディスプレイ法は、生理活性ペプチドの探索⁷⁻¹⁰、プロテアーゼの認識配列¹¹⁻¹³やタンパク質のリン酸化サイトの同定¹⁴⁻¹⁶にも使用され、DNA 配列を特異的に認識する Zn フィンガータンパク質の DNA 結合特異性の改変¹⁷など、タンパク質機能改変にも応用されている。さらに、抗体の結合部位である VH と VL をリンカーでつないだ scFv (一本鎖抗体) や Fab の形でファージ表面への提示が可能であることが報告されて以来¹⁸、ファージディスプレイ法はヒト抗体作製技術としても利用されている¹⁸⁻²⁰。

一方、標的物質に対して結合する核酸分子 (アプタマー) は、1990 年に Szostak らのグループにより開発された *in vitro* セレクション法 (試験管内分子進化法)²¹を用いることにより自在に作製可能となった。*in vitro* セレクション法は、多様化した塩基配列により構成された核酸ライブラリーから、選択、増幅を繰り返し、試験管内で自然界の進化の過程を人為的に再現することで、目的とする機能を有する核酸分子を選択する手法である。RNA アプタマーを選択する一般的な方法を以下に示す (図 1-3)。まず、ランダムな塩基配列を含む RNA ライブラリーを構築し、アガロースなどの担体に固定化した標的物質を用いて、標的分子に対して結合活性を有する RNA 分子を選択する。続いて、選択した RNA 分子を逆転写反応により DNA へと変換し、PCR 法により増幅することで DNA ライブラリーを作製する。DNA ライブラリーを転写反応により再び RNA ライブラリーとし、次のサイクルに用いる。これら一連の選択、増幅操作

を繰り返し行うことにより、RNA ライブラリーは標的分子に対して結合する RNA 分子種に収束する。これら収束した各 RNA 分子の塩基配列情報は、DNA ライブラリーの塩基配列解析により得ることができる。得られた塩基配列情報をもとに各 RNA 分子を作製し、機能評価を行うことで RNA アプタマーであるかを判定し、任意の標的分子に結合する RNA アプタマーが作製される。現在までに、この手法を用いて得られているアプタマーは、アミノ酸²²⁻²⁵、抗生物質^{26,27}などの低分子物質²⁸⁻³²から、ペプチド³³⁻³⁶、タンパク質³⁷⁻⁴³まで幅広い物質を標的にすることができ^{44,46}、それらの一部はデータベース化されている (<http://aptamer.icmb.utexas.edu/>)⁴⁷。in vitro セレクション法により、任意の標的物質に対して高い親和性及び選択性を有するアプタマーが作製可能であることから、最近では診断システムや創薬へのアプタマーの応用が関心を集めている⁴⁸⁻⁵⁰。

現在までに、抗体作製技術をはじめ上述したファージディスプレイ法や in vitro セレクション法を用いることにより、任意の標的分子に結合するテーラーメイド生体高分子リセプターを作製することが可能になった。これらの手法を用いて、基質分子の反応遷移状態を構造的かつ電子的に模倣した遷移状態アナログ分子に結合するモノクローナル抗体（抗体触媒）⁵¹や RNA アプタマー⁵²などが作製され、いくつかの生体高分子リセプターは触媒活性を示した。しかしながら、遷移状態アナログ分子に結合する抗体もしくは RNA を作製するこれらの方法論^{51, 52}では、天然の酵素に匹敵する触媒活性を生み出すことはできていない。生体高分子を用いて天然の酵素活性に劣らないテーラーメイド酵素を創製する方法論を開発するためには、基質が厳密な配向性のもとに結合し、基質の基底状態、反応遷移状態および反応生成物に合わせて構造変化が可能な化学反応場の設計が必要である。

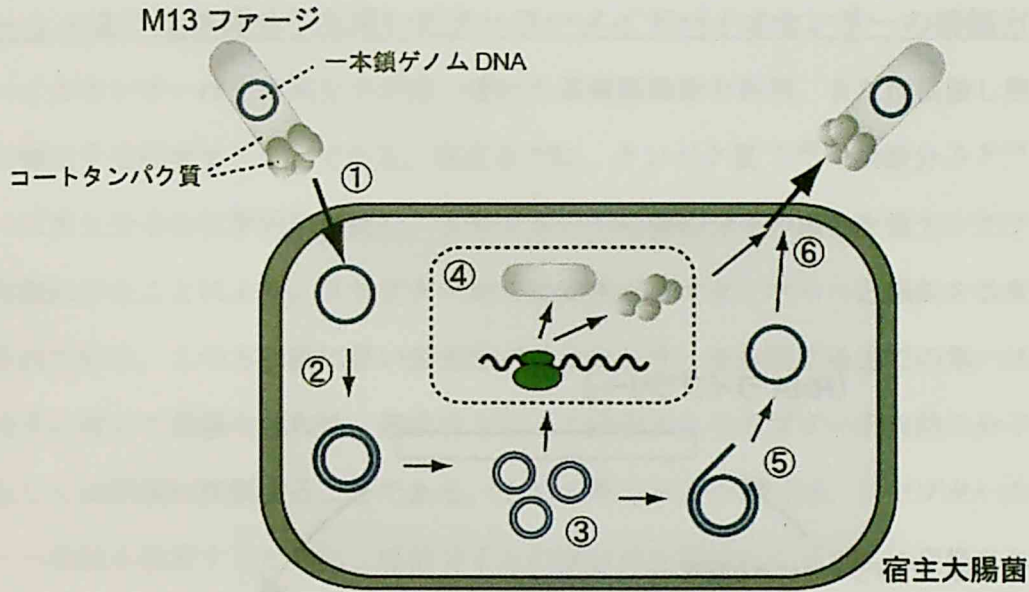


図 1-1 繊維状ファージ (M13 ファージ) の生活環

①ファージが宿主大腸菌に感染。②注入された一本鎖ゲノム DNA を鋳型にして、二本鎖 DNA が合成される。③合成された二本鎖 DNA が複製される。④コートタンパク質が合成されると同時に⑤子孫ゲノム DNA が複製される。⑥コートタンパク質、一本鎖 DNA が集積し、成熟したファージとなり放出される。

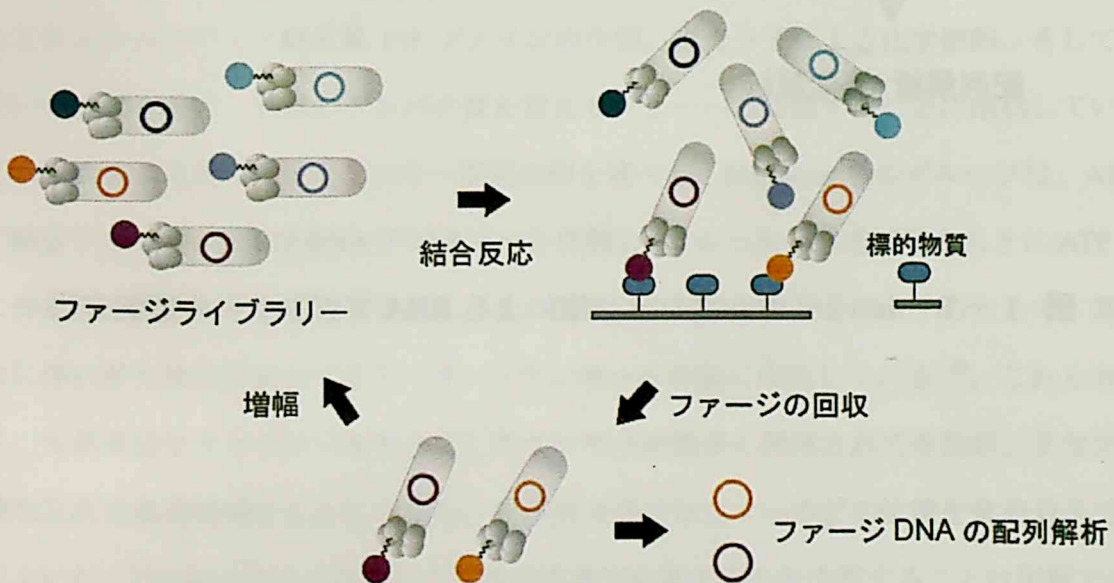


図 1-2 ファージディスプレイ法を用いたバイオパニング

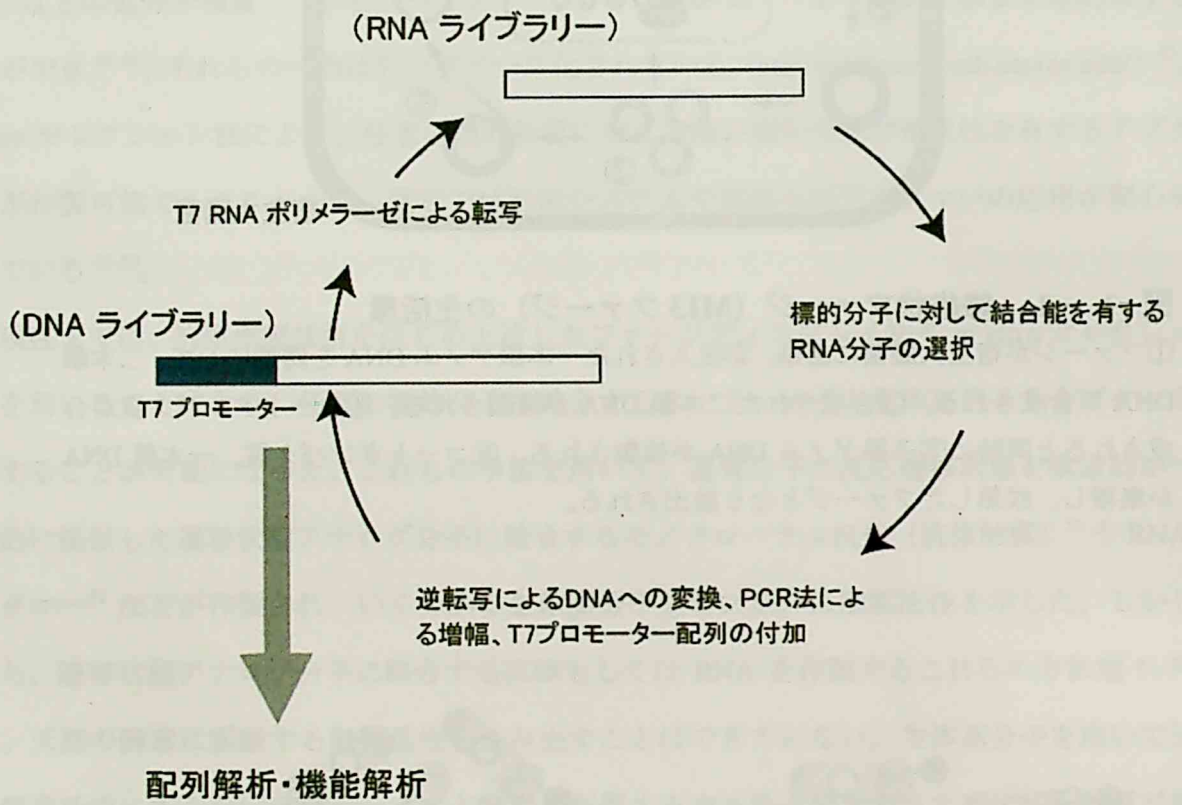


図 1-3 *in vitro* セレクション法による RNA アプタマーの選択方法

1-1-2 生体高分子を用いたテララーメイドバイオセンサーの構築方法

バイオセンサーは生体高分子が持つ優れた基質認識能を利用、または模倣し標的分子を定量的に検出する化学センサーである。現在までに、タンパク質⁵³⁻⁶⁰や核酸分子⁶¹⁻⁷⁸などのリセプターに蛍光分子を化学的に修飾し、リセプターへの標的分子の結合を蛍光シグナルによって検出可能にすることにより、リセプターから蛍光性バイオセンサーへと機能を改変できることが示されている。この方法論に従い蛍光性バイオセンサーを作製する上での第一ステップは、標的分子に対して最適な親和性、選択性をもって結合するリセプターを天然の分子から探索するかもしくは新規に作製することである。そして第二ステップでは、リセプターから蛍光性センサーへ機能を改変するために、標的分子との結合が光学的なシグナルに変換されるよう、リセプターの三次元構造情報を元に蛍光分子を導入する位置を検討し、変異体を作製する。その後、変異体に蛍光分子を化学修飾し、センサーとしての評価を行うことにより、望みとする基質結合および蛍光特性を有する蛍光センサーを作製する。天然タンパク質を用いた蛍光センサーの作製例として、イノシトール三リン酸 (IP_3) に対する蛍光性センサーの構築について述べる⁶⁰。天然に存在する PH ドメインタンパク質は、 IP_3 と選択的に結合すること及び、三次元構造が既に明らかになっている。この三次元構造情報をもとに、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が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 ドメインの作製、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ている。続いて、核酸分子を用いた蛍光センサー作製の例を述べる。Ellington らのグループは、ATP に対して結合する DNA および RNA アプタマーを作製し、その三次元構造情報をもとに ATP との結合に伴い構造が変化する位置を予測し、その位置に蛍光修飾核酸を導入することで、基質との結合に伴い蛍光強度が変化するアプタマーセンサーの作製に成功している⁶⁵。これら方法論により、生体高分子リセプターをもとにしたセンサーが数多く開発されてきたが、リセプターの詳細な三次元構造情報をもとにしても、生体高分子リセプターのどの位置を蛍光分子で修飾すればよいか、どの蛍光分子が目的とする蛍光波長で応答するかを予測することは困難である。また、蛍光分子で化学修飾した生体高分子リセプターは、本来の結合活性や安定性を失う可能性がある。したがって、任意の標的分子に対する蛍光性センサー、すなわちテララーメイド蛍

光センサーを生体高分子リセプターをもとにして簡便に構築するためには新しい方法論の開発が必要である。

1-1-3 触媒活性を有する RNA 分子と高機能な RNA-タンパク質複合体

生体内に存在する RNA は、遺伝情報が記されたメッセンジャーRNA (mRNA)、アミノ酸をリボソームに運搬する転移 RNA (tRNA)、リボソームの構造を形成するリボソーム RNA (rRNA) である。上に示したどの RNA も遺伝情報が DNA からタンパク質へ伝達されるための仲介役に過ぎず、生体内において種々の代謝・生理反応を触媒するのはタンパク質酵素であると考えられていた。また、真核生物の遺伝子がアミノ酸配列情報を持たない領域 (イントロン) と、アミノ酸配列をコードしている領域 (エキソン) に分断されていることが発見された⁷⁹。1981 年、Cech らは原生動物繊毛虫の一種である *Tetrahymena* (テトラヒメナ) の rRNA 遺伝子の研究過程で、前駆体 rRNA 中のイントロンが切り出され、成熟 RNA 分子が生じるスプライシング反応が、タンパク質を必要とせず、RNA のみで反応が進行することを発見した^{80,81}。この発見により、生体内で化学反応を触媒しているのはタンパク質酵素だけではなく、RNA も触媒活性を有していることが示され、触媒活性を示す RNA は「リボザイム」と命名された。

核内には様々な 300 ヌクレオチド未満の snRNA と呼ばれる小さな RNA が含まれており^{82,83}、これらの RNA は特異的なタンパク質と結合し、snRNP (Small Nuclear RNA and Protein complex) と呼ばれる複合体を形成する。さらに、これらはスプライシング因子と呼ばれる複数のタンパク質と複合体を形成することにより、スプライソソームと呼ばれる巨大な RNA-タンパク質複合体を形成する。このスプライソソームは、RNA とタンパク質が複合体を形成することにより、RNA スプライシング反応を担っている。生体内に存在する RNA-タンパク質複合体酵素として、原核生物の tRNA 前駆体分子の 5' 末端からヌクレオチドを取り除くことによって tRNA 分子の成熟を触媒するリボヌクレアーゼ P (RNase P)⁸⁴ や、タンパク質合成に関わるリボソームが挙げられる。リボソームは、近年 X 線回折法による結晶構造解析により詳細な三次元立体構造が解明され (図 1-4)、その触媒活性を担っているのは RNA であることが明らかになったが^{85,86}、その機能はタンパク質と複合体を形成することにより発揮される。このように、生体内には高機能な RNA-タンパク質複合体が数多く存在していることが明らかになっている。

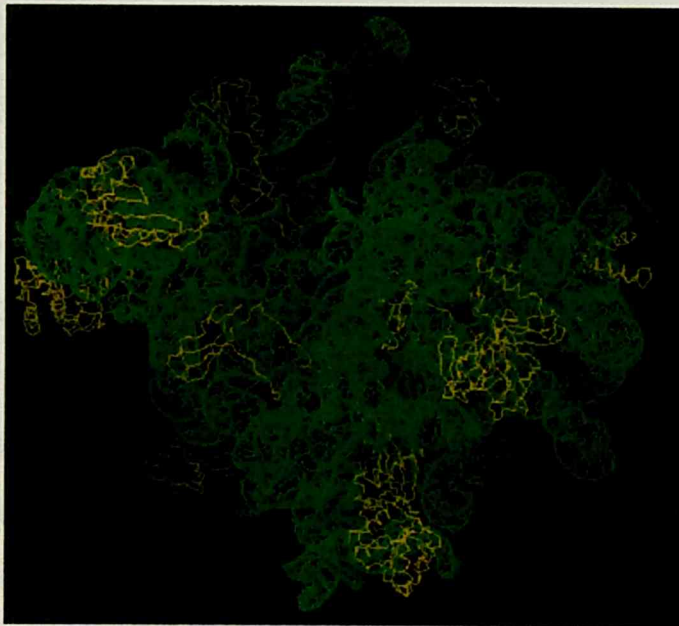


図 1-4 リボソーム 50S サブユニットの構造

X線回折法による結晶構造解析により明らかになったリボソーム 50S サブユニットの三次元立体構造⁸⁵。RNA は緑色、タンパク質は黄色で表示している。

1-2 RNA-ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製

現在までに、RNA およびタンパク質を利用した機能性生体高分子を目的に合わせて設計または作製する上で、RNA もしくはタンパク質をそれぞれ単独で機能化する方法は数多く試みられている。しかしながら、RNA-ペプチド複合体（リボヌクレオペプチド、RNP）を用いた機能性生体高分子を作製する試みは、生体内に数多くの機能性 RNP が存在するにもかかわらず、未だ端緒についたばかりである。現在までに森井らは、天然に存在する RRE RNA と Rev ペプチドの複合体⁸⁷を基本骨格とし、RNA サブユニットを多様化した RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用することにより、ATP（アデノシン三リン酸）に高選択的に結合する ATP 結合性 RNP リセプターを選択する方法論を開発した（図 1-5）⁸⁸。この方法論で作製された ATP 結合性 RNP リセプターは、RNP が複数のサブユニットから形成されているという点から、引き続きペプチドサブユニットの機能化が可能である。本論文では ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに着目し、RNP リセプターの高機能化および機能改変する方法論の開発を行った。本論文は（1）多様化したペプチドサブユニットを用いて、ATP 結合性 RNP リセプターの分子認識能を段階的に向上させる方法論（図 1-6 (A)）、（2）蛍光分子を導入したペプチドサブユニットを用いて、RNP リセプターを蛍光性 RNP センサーに機能改変し、望みとする基質結合および蛍光特性を有する「テーラーメイド蛍光センサー」を構築する方法論（図 1-6 (B)）及び、（3）基質分子を化学修飾したペプチドサブユニットを用いて、基質結合配向性を制御した RNP リセプターを作製する方法論（図 1-6 (C)）の開発を目的とした。本論文では、これら三つの方法論を開発することにより、RNA-タンパク質複合体を用いたテーラーメイド酵素を作製するための基盤的方法論を確立し、機能性 RNP 創製という新しい分野を開拓する。

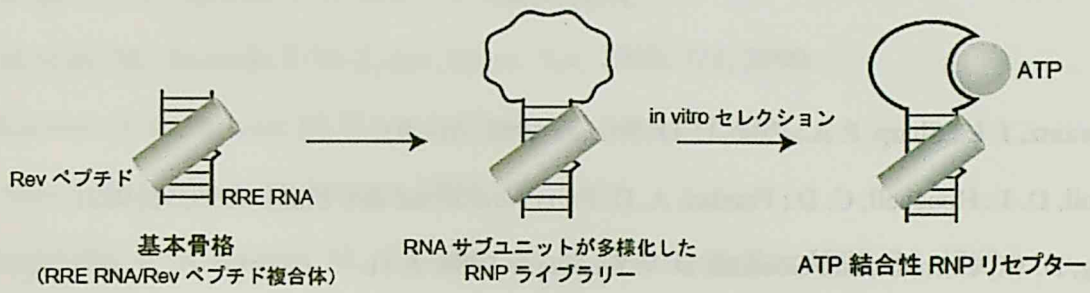


図 1-5 ATP 結合性 RNP リセプターの構築方法
(Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4617.)

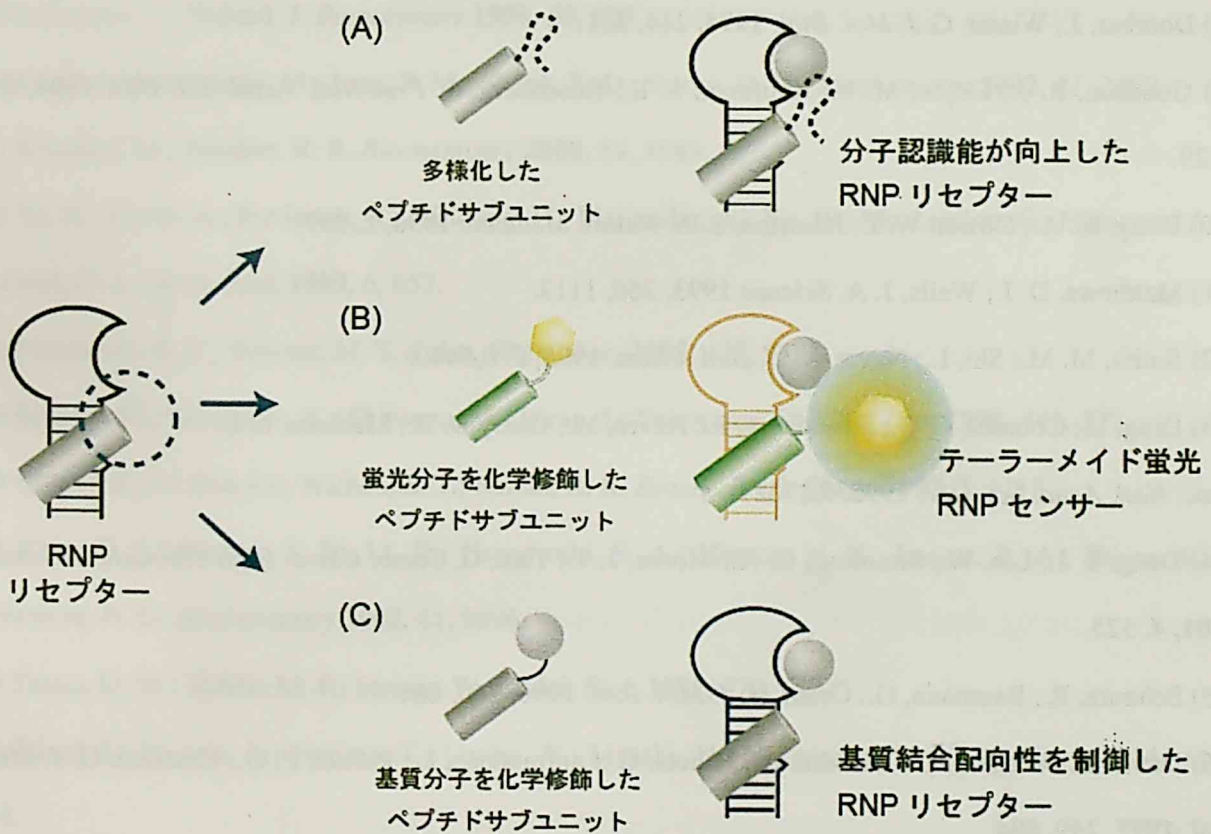


図 1-6 RNA-ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製

RNP リセプターのペプチドサブユニットを利用し、機能化および機能改変する方法の概略図。(A) RNP リセプターの段階的高機能化方法の開発、(B) テララーメイド蛍光 RNP センサーの構築、(C) 基質結合配向性を制御した RNP リセプターの構築

引用文献

- (1) Pomerantz, J. L.; Sharp, P. A.; Pabo, C. O. *Science* **1995**, 267, 93.
- (2) McColl, D. J.; Honchell, C. D.; Frankel, A. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 9521.
- (3) Leung, D. W., Chen, E., and Goeddel, D. V. *Technique* **1989**, 1, 11.
- (4) Stemmer, W.P.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 10747.
- (5) Cronin, C. N.; Kirsch, J. F. *Biochemistry* **1988**, 27, 4572.
- (6) Smith, G. P. *Science*, **1985**, 228, 1315.
- (7) O'Neil, K. T.; Hoess, R. H.; Jackson, S. A.; Ramachandran, N. S.; Mousa, S. A.; DeGrado, W.F. *Proteins* **1992**, 14, 509.
- (8) Doorbar, J.; Winter, G. *J. Mol. Biol.* **1994**, 244, 361.
- (9) Goodson, R. J.; Doyle, M. V.; Kaufman, S. E.; Rosenberg, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 7129.
- (10) Barry, M. A.; Dower, W. J.; Johnston, S. A. *Nature Medicine* **1996**, 2, 299.
- (11) Matthews, D. J.; Wells, J. A. *Science* **1993**, 260, 1113.
- (12) Smith, M. M.; Shi, L.; Navre, M. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 6440.
- (13) Ding, L.; Coombs, G. S.; Strandberg, L.; Navre, M.; Corey, D. R.; Madison, E. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7627.
- (14) Deng, S. J.; Liu, W.; Simmons, C. A.; Moore, J. T.; Tian, G. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2001**, 4, 525.
- (15) Schmitz, R.; Baumann, G.; Gram, H. *J. Mol. Biol.* **1996**, 260, 664.
- (16) Dente, L.; Vetriani, C.; Zucconi, A.; Pelicci, G.; Lanfrancone, L.; Pelicci, P. G.; Cesareni, G. *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 694.
- (17) Rebar, E. J.; Pabo, C. O. *Science*, **1994**, 263, 671.
- (18) Marks, J. D.; Hoogenboon, H. R.; Bonnert, T. P. *et al.*; *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 581.
- (29) Nizak, C.; Monier, S.; Nery, E. del; Moutel, S.; Goud, B.; Perez, F. *Science* **2003**, 300, 984.
- (20) Bradbury, A. R. M.; Marks, J. D. *J. Immunol. Methods.* **2004**, 290, 29.

- (21) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- (22) Famulok, M.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990.
- (23) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9382.
- (24) Connell, G. J.; Yarus, M. *Science* **1994**, *264*, 1137.
- (25) Burgstaller, P.; Kochoyan, M.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4769.
- (26) Schurer, H.; Stembera, K.; Knoll, D.; Mayer, G.; Blind, M.; Forster, H.; Famulok, M.; Welzelb, P.; Hahna, U. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2557.
- (27) Wilson, C.; Nix, J.; Szostak, J. W.; *Biochemistry* **1998** *37*, 14410.
- (28) Saran, D.; Frank, J.; Burke, D. H. *BMC Evol. Biol.* **2003**, *3*, 26.
- (29) Mannironi, C.; DiNardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
- (30) Schneider, C.; Suhnel, J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 287.
- (31) Roychowdhury-Saha, M.; Lato, S. M.; Shank, E. D.; Burke, D. H.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 2492.
- (32) Koizumi, M.; Breaker, R. R. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8983.
- (33) Ye, X.; Gorin, A.; Frederick, R.; Weidong, H.; Majumdar, A.; Xu, W.; Mc-Lendon, G.; Ellington, A. D.; Patel, D. J. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 657.
- (34) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9382.
- (35) Kimoto, M.; Sakamoto, K.; Shirouzu, M.; Hirao, I.; Yokoyama, S. *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 322.
- (36) Gilbert, B. A.; Sha, M.; Wathen, S. T.; Rando, R. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1115.
- (37) King, D. J.; Bassett, S. E.; Li, X.; Fennewald, S. A.; Herzog, N. K.; Luxon, B. A.; Shope, R.; Gorenstein, D. G.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 9696.
- (38) Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688.
- (39) Hirao, I.; Harada, Y.; Nojima, T.; Osawa, Y.; Masaki, H.; Yokoyama, S. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3214.
- (40) Tian, Y.; Adya, N.; Wagner, S.; Giam, C.; Green, M. R.; Ellington, A. D. *RNA* **1995**, *1*, 317.
- (41) Kim, S. J.; Kim, Y.; Lee, J. H.; You, J. C.; Jeong, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 925.
- (42) Weiss, S.; Proske, D.; Neumann, M.; Groschup, M. H.; Kretzschmar, H.; Famulok, M.; Winnacker,

- E. J. Virol.* **1997**, *71*, 8790.
- (43) Hornung, V.; Hofmann, H.; Sprinz, M.; *Biochemistry* **1998**, *37*, 7260.
- (44) Sassanfar, M.; Szostak, J. W. *Nature* **1993**, *364*, 550.
- (45) Ellington, A. D. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 427.
- (46) Gold, L.; Polisky, B.; Uhlenbeck, O.; Yarus, M. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763.
- (47) Jennifer F. Lee, J. F.; Hesselberth, J. R.; Meyers, L. A.; Ellington, A. D. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D95.
- (48) Lupold, S. E.; Hicke, B. J.; Lin, Y.; Coffey, D. S. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4029.
- (49) Martell, R. E.; Nevins, J. R.; Sullenger, B. A. *Mol. Ther.* **2002**, *6*, 30.
- (50) Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628.
- (51) Schultz, P. G.; Lerner, R. A. *Science* **1995**, *269*, 1835.
- (52) Prudent, J. R.; Uno, T.; Schultz, P. G. *Science* **1994**, *264*, 1924.
- (53) Pollack, S. J.; Nakayama, G. R.; Schultz, P. G. *Science* **1988**, *242*, 1038.
- (54) Renard, M.; Belkadi, L.; Hugo, N.; England, P.; Altschuh, D.; Bedouelle, H. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 429.
- (55) Gilardi, G.; Zhou, L. Q.; Hibbert, L.; Cass, A. E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3840.
- (56) de Lorimier, R. M.; Smith, J. J.; Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Sali, K. M.; Paavola, C. D.; Rizk, S. S.; Sadigov, S.; Conrad, D. W.; Loew, L.; Hellinga, H. W. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2655.
- (57) Marvin, J. S.; Corcoran, E. E.; Hattangadi, N. A.; Zhang, J. V.; Gere, S. A.; Hellinga, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4366.
- (58) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12065.
- (59) Benson, D. E.; Conrad, D. W.; de Lorimier, R. M.; Trammell, S. A.; Hellinga, H. W. *Science* **2001**, *293*, 1641.
- (60) Morii, T.; Sugimoto, K.; Makino, K.; Otsuka, M.; Imoto, K.; Mori, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1138.
- (61) Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628.
- (62) Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.

- (63) Jhaveri, S.; Rajendran, M.; Ellington, A. D. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1293.
- (64) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547.
- (65) Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469.
- (66) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928.
- (67) Fang, X. H.; Cao, Z. H.; Beck, T.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5752.
- (68) Stojanovic, M. N.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9678.
- (69) Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- (70) Stojanovic, M. N.; Green, E. G.; Semova, S.; Nikic, D. B.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6085.
- (71) Stojanovic, M. N.; Kolpashchikov, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9266.
- (72) Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3429.
- (73) Ho, H. A.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384.
- (74) Kirby, R.; Cho, E. J.; Gehrke, B.; Bayer, T.; Park, Y. S.; Neikirk, D. P.; McDevitt, J. T.; Ellington, A. D. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4066.
- (75) Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3194.
- (76) Jiang, Y. X.; Fang, X. H.; Bai, C. L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5230.
- (77) Nutiu, R.; Li, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1061.
- (78) Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *127*, 12766.
- (79) Berget, S. M.; Moore, C.; Sharp, P. A. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **1997**, *74*, 3171.
- (80) Cech, T. R.; Zaug, A. J.; Grabowski, P. J. *Cell* **1981**, *27*, 487.
- (81) Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. *Cell* **1982**, *31*, 147.
- (82) Stark, H.; Dube, P.; Luhrmann, R.; Kastner, B. *Nature* **2001**, *409*, 539.
- (83) Caprara, M. G.; Nilsen, T. W. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 831.
- (84) Puglisi, J. D.; Blanchard, S. C.; Green, R. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 855.
- (85) Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 905.

(86) Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 920.

(87) Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhandiram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.

(88) Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.

第二章

RNA - ペプチド複合体リセプターの段階的高機能化法の開発

2 - 1 RNA - ペプチド複合体を用いた段階的高機能化法

生体高分子を用いて天然の酵素活性に劣らないテラーメイド酵素を創製するには、構造変化を伴い、基質の基底状態には準安定状態で結合し、遷移状態には高い親和性を示し、生成物には親和性を示さない性質を有するリセプターを作製する方法論が必要である。このようなリセプターは、複数の生体高分子サブユニットから形成される複合体の各サブユニットを順次機能化することにより作製できると考えられる。森井らは、RNA とペプチドの複合体（リボヌクレオペプチド複合体、RNP）の RNA サブユニットに *in vitro* セレクション法を適用し、RNP リセプターを作製する方法論を開発した¹。RNP は二つの生体高分子サブユニットから形成されていることから、各サブユニットを段階的に機能化することが可能である。RNP の第一段階機能化では森井らが開発した方法論に従い、RNA サブユニットを多様化することにより RNP リセプターを作製できる。第二段階機能化では引き続きペプチドサブユニットの多様化が可能であり、第一機段階機能化では達成できなかった、基質分子のさらなる特徴的な部分構造を認識する高機能な RNP リセプターを作製できると考えられる（図 2 - 1）。また、RNP の各サブユニットには *in vitro* セレクション法²およびファージディスプレイ法³を適用することができるため、各サブユニットを多様化させたライブラリーから高機能な RNP リセプターを選択することができる。本章では、RNP の RNA サブユニット及びペプチドサブユニットを多様化し、順次機能化することで、段階的に RNP リセプターを高機能化する、RNP リセプターの段階的高機能化法を開発することを目的とした（図 2 - 1）。

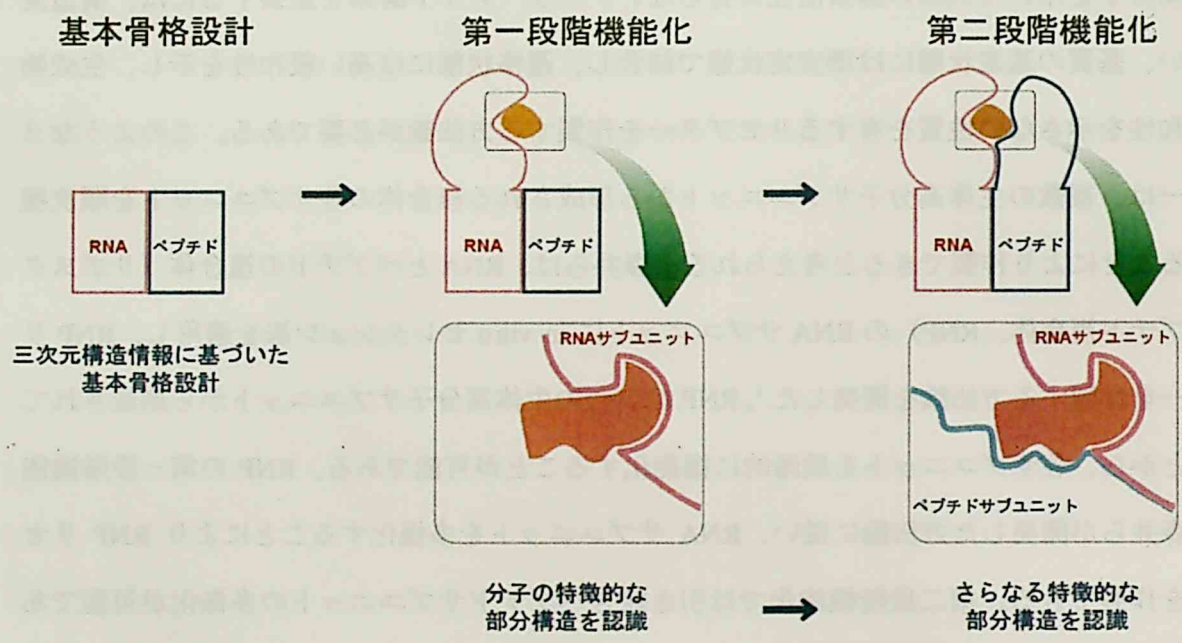


図 2-1 RNP リセプターの段階的高機能化法の概略図

2-1-1 ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法

RNP リセプターの段階的高機能化法の開発にあたり、本章では ATP (アデノシン三リン酸) を基質分子として用いた。現在までに、多様化した RNA サブユニットにより形成される RNP ライブラリーから、ATP に対して高選択的に結合する ATP 結合性 RNP リセプターを選択する方法論が既に示されている¹。この方法論では、(1) ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 由来の RRE RNA と Rev ペプチドの複合体⁴を基本骨格とし、(2) RRE RNA にランダムな 20 塩基配列を導入した RNA サブユニットライブラリーと Rev ペプチドサブユニットの複合体により、RNP ライブラリーを作製し、(3) RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用し ATP 結合性 RNP リセプターを選択する¹。本章では、上記方法論により作製した ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットを多様化し、高機能な ATP 結合性 RNP リセプターを段階的に構築する方法論の開発を目的とした。ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化戦略について以下に示す。まず、上記方法論に従い、RRE RNA と Rev ペプチドの複合体の RNA サブユニットに、ランダムな 30 塩基配列を導入した RNP ライブラリーを作製する。第一段階機能化では、RNP ライブラリーから ATP に対して結合能を有する RNP リセプターを *in vitro* セレクション法により選択する (図 2-2A)。第一段階機能化で得られる ATP 結合性 RNP リセプターは、RNA サブユニットの ATP 結合場が最適化される。続いて第二段階機能化では、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットにランダムな 7 アミノ酸により構成されるループ構造を導入し、ペプチドサブユニットを多様化する。ループ構造を構成する 7 アミノ酸はフェージディスプレイ法³を適用しライブラリー化する。RNA サブユニットが最適化された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと、ライブラリー化したループ構造と Rev ペプチドを提示したフェージペプチドライブラリー (LpRev フェージペプチドライブラリー) の複合体を形成させることにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーを作製する。そのライブラリーから新たに ATP に対してバイオパンニングを行い、高い親和性で ATP に結合する RNP リセプターを選択する。この第二段階機能化で得られる ATP 結合性 RNP リセプターは、RNA サブユニットに対して最適な ATP 結合場がペプチドサブユニットにより形成されるため、RNA サブユニットのみを機能化した RNP リセプターよりも高い ATP 親和性と ATP 選択性を有した ATP 結合性 RNP リセプターの選択が可能である (図 2-2B)。

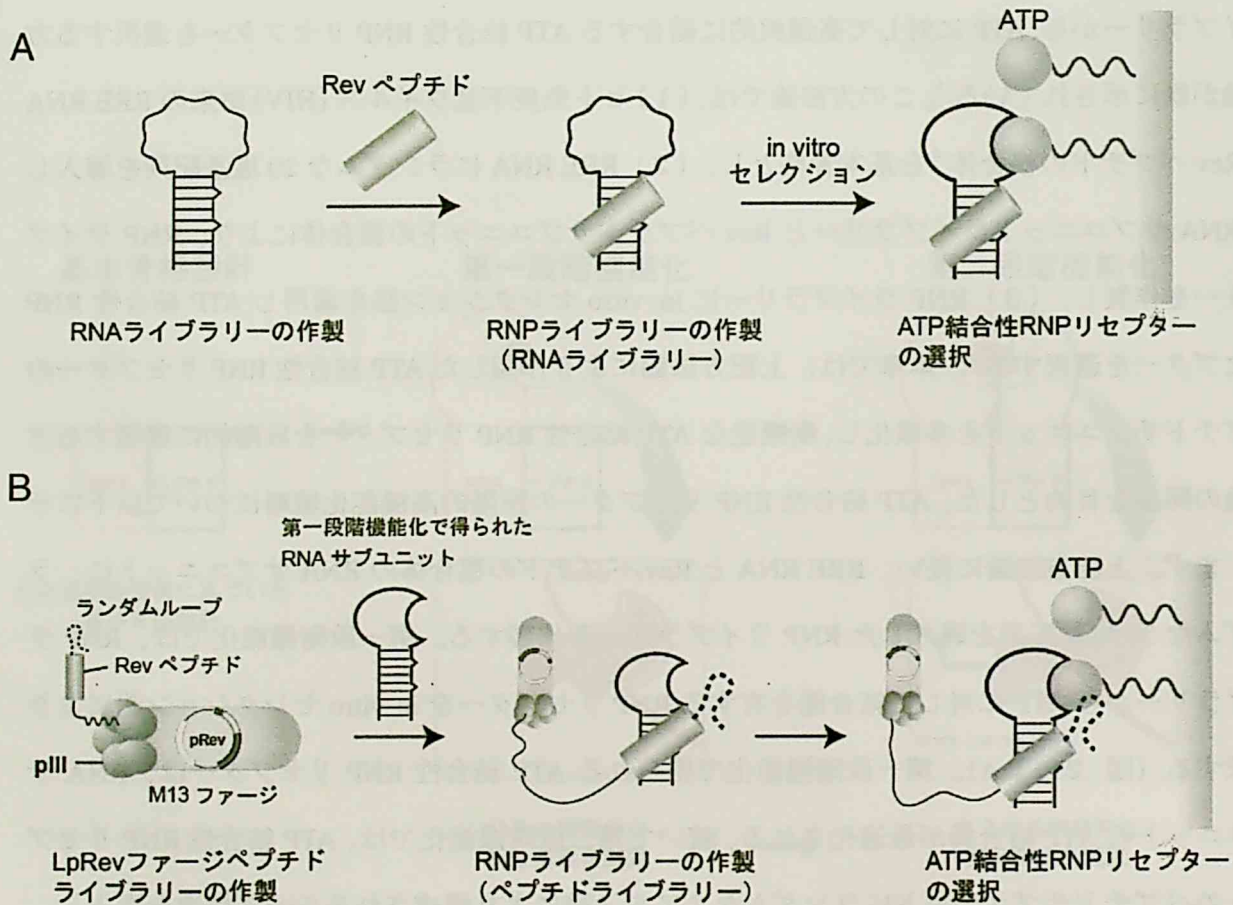


図 2-2 ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法の概略図

- (A) 第一段階機能化 (RNA サブユニットの最適化) の方法を示す。多様化した RNA サブユニットと Rev ペプチドの複合体から形成される RNP ライブラリーを用いて、in vitro セレクション法により ATP 結合性 RNP リセプターを選択する。
- (B) 第二段階機能化 (ペプチドサブユニットの最適化) の方法を示す。ファージディスプレイ法を適用して作製した LpRev ファージペプチドライブラリーと、第一段階機能化で得られた ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーを作製する。この RNP ライブラリーを用いて ATP に対してバイオパニングを行い、ATP 結合性 RNP リセプターを選択する。

2-2 RNA サブユニットの機能化による ATP 結合性 RNP リセプターの構築 (第一段階機能化)

2-2-1 三次元構造に基づいた RNP ライブラリーの分子設計

RNP の第一段階機能化を行うためには、多様化した RNA サブユニットにより形成される RNP ライブラリーを作製する必要がある。まず、森井らの設計¹に従い、Rev ペプチドと RRE RNA の複合体構造⁴ (図 2-3) を基本骨格として用いた。NMR 法により解析された RRE-RNA 配列中の A52 : U64 塩基対までの Rev ペプチド結合領域のステム部分を保存し、G53 から C65 までの領域に、ランダムな 30 塩基配列を基質結合部位となるように導入した (図 2-4)。この方法により、Rev ペプチドとの結合領域とランダム領域を有する RNA サブユニットライブラリーが作製される。RNA サブユニットライブラリーと Rev ペプチドの複合体により形成される RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用することで、基質分子に対し優れた親和性、選択性を有する RNP リセプターを選択することができる (図 2-4)。この方法論では、RNP リセプターの RNA サブユニットが形成する基質結合場が、Rev ペプチドの N 末端領域に近接するように設計されている。このため、第二段階機能化において Rev ペプチドサブユニットの N 末端領域に、アミノ酸残基で形成される基質結合場を導入することにより、RNP リセプターを高機能化することが可能である。

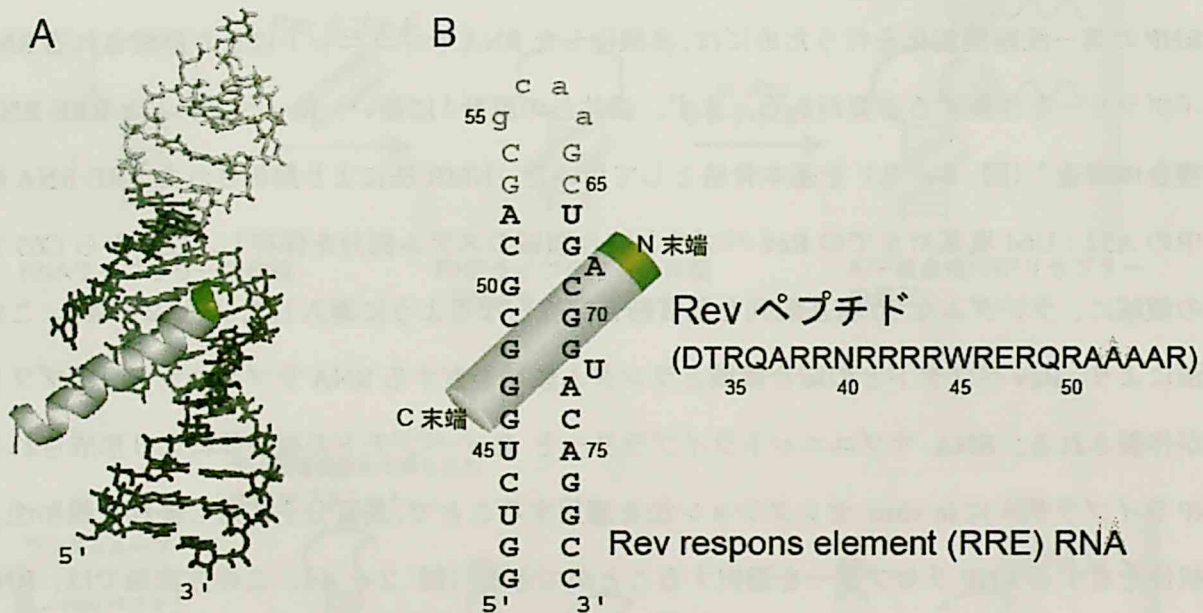


図 2-3 NMR 構造解析による HIV 由来の Rev ペプチドと RRE RNA の構造

(A) NMR 構造解析による HIV 由来の Rev ペプチドと RRE RNA の構造⁴。Rev ペプチドはリボン表示、RRE RNA はスティック表示 (A52 : U64 塩基対までを黒色、G53 から C65 までを灰色で表示) している。Rev ペプチド N 末端側 3 残基は緑色で表示している。

(B) Rev ペプチド/RRE RNA 複合体の模式図と配列。RRE RNA の大文字はステム領域、小文字はループ領域を示す。番号は天然の RRE IIB の塩基配列に準じて表示している。Rev ペプチドのアミノ酸配列の番号は、天然の Rev タンパク質のアミノ酸配列に準じて表示している。

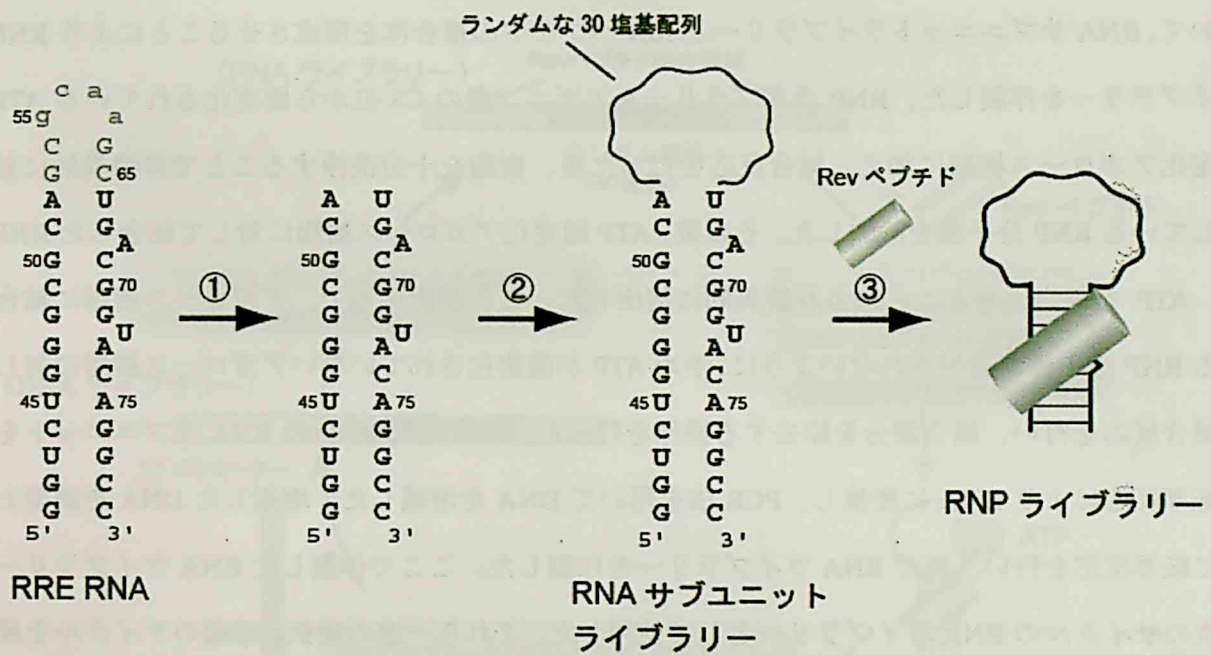


図 2-4 Rev ペプチドと RRE RNA の複合体を基本骨格とした RNP ライブラリーの作製

①RRE RNA の G53 から C65 の領域を削除し、②そこにランダムな 30 塩基配列導入し RNA サブユニットライブラリーを作製した。③RNA サブユニットライブラリーと Rev ペプチドの複合体を形成させることにより、RNA サブユニットが多様化した RNP ライブラリーが作製できる。

2-2-2 in vitro セレクション法を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択

RNP の第一段階機能化として、RNA サブユニットに対して *in vitro* セレクション法を適用し、ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法は、森井らの開発した方法論に従った¹。その選択方法を以下に示す。まず、ランダムな 30 塩基配列を導入した DNA を調製し、*in vitro* 転写反応により RNA サブユニットライブラリーを作製した。続いて、RNA サブユニットライブラリーと Rev ペプチドの複合体を形成させることにより RNP ライブラリーを作製した。RNP ライブラリーをアデニン環の C8 位から固定化されている ATP 固定化アガロース樹脂に加え、結合反応を行った後、樹脂を十分洗浄することで非特異的に結合している RNP 分子種を除去した。その後、ATP 固定化アガロース樹脂に対して結合した RNP を、ATP を競合させることにより特異的に溶出した。この選択過程で、アガロース樹脂に結合する RNP 分子種が選択されないように、予め ATP が固定化されていないアガロース樹脂に対して結合反応を行い、結合画分を除去する操作を行った。溶出した RNP の RNA サブユニットを逆転写反応により DNA に変換し、PCR 法を用いて DNA を増幅した。増幅した DNA を鋳型として転写反応を行い、再び RNA ライブラリーを作製した。ここで作製した RNA ライブラリーは次のサイクルの RNA ライブラリーとして使用した。これら一連の選択、増幅のサイクルを繰り返し行うことで、ATP に対して結合活性を有する RNP リセプターの選択を行った (図 2-5)。このサイクルを 10 回行った後、DNA 塩基配列解析を行い、選択された RNA サブユニットの塩基配列を確認した (図 2-6)。その結果、9 塩基の高度に保存された配列 5'-GUGUA-UA-CU-3' 配列を有する RNA サブユニットを得ることができた。この保存配列は、ランダムな 20 塩基配列を導入した RNP ライブラリーから選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと同様の配列であった¹。しかしながら、以前得られた配列とは異なり、RNA18 や 08 に見られるように、保存配列がランダム領域内の 5'側や 3'側に偏った位置に存在する RNA サブユニットが今回新たに選択された。

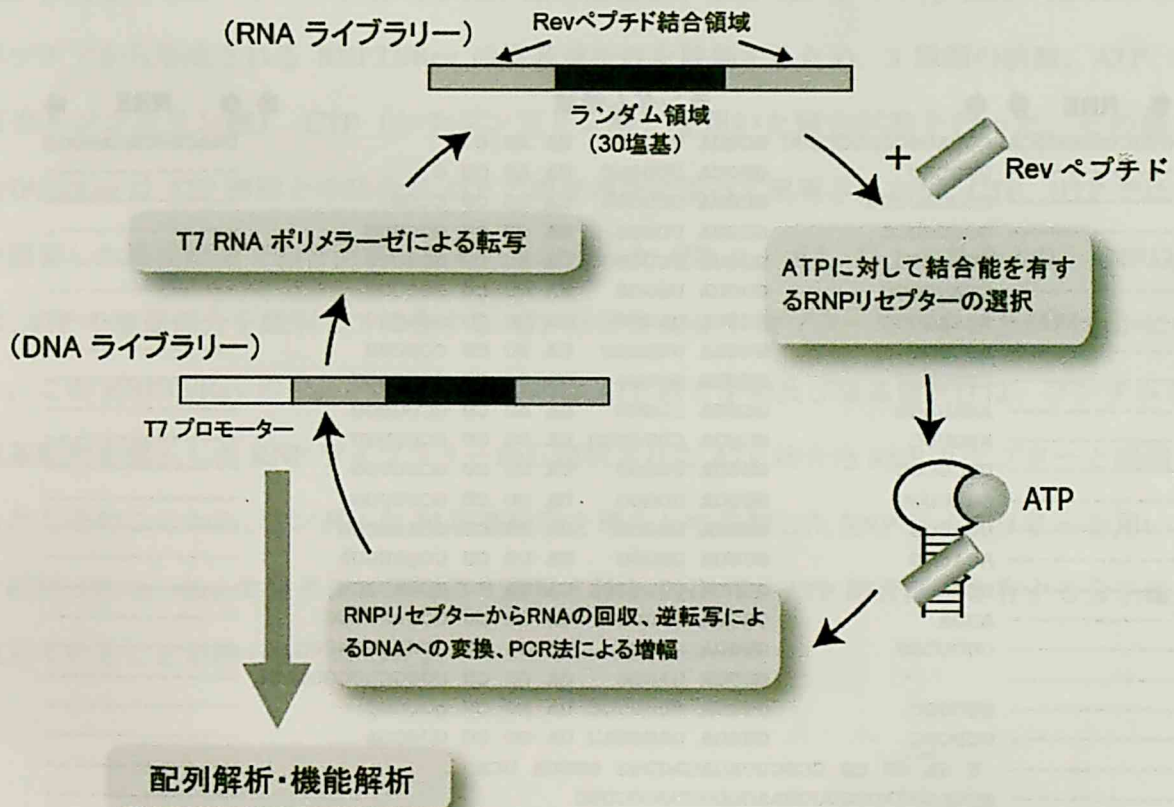


図 2-5 *in vitro* セレクション法を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法

	◀ RRE ▶		ランダム領域		▶ RRE ▶
18	GGUCUGGGCGCA	CUUAUGUGCGGCGUC	GUGUA UGGGG	UA AU C	UGACGGUACAGGCC
02	-----	UGUCAU	GUGUA UUUGGG	UA AG CU G	-----
21	-----	CGUGAUUGG	GUGUA GUGGGG	UA UG CU CCGA	-----
04	-----	UGCUGUCC	GUGUA UUGGG	UA GU CU GGCUG	-----
34	-----	UUUCGU	GUGUA UUUCGGG	UA AU CU ACGGUU	-----
13	-----	CCAUGCCC	GUGUA UGGGG	UA GU CU GGGUGU	-----
25	-----	AUAACUCC	GUGUA UAGGG	UA GU CU GGAUGU	-----
30	-----	AUCUGG	GUGUA UUAGGG	UA UU CU CCUCUU	-----
05	-----	UUUGAGU	GUGUA GGGGG	UA GC CU GCUCGU	-----
06	-----	AGAUAGG	GUGUA UUGGG	UA AU CU CCUGUGU	-----
14	-----	AUGUGC	GUGUA CUUGGGG	UA GU CU GCUUUGU	-----
33	-----	UUCUCGU	GUGUA UGGGG	UA UG CU GCGUUGG	-----
35	-----	CAAUUGG	GUGUA UUGGG	UA GU CU UCUUUUG	-----
09	-----	UCAUGG	GUGUA UGGGG	UA UG CU CCAUGCUG	-----
17	-----	ACAUGG	GUGUA UGGGG	UA UG CU CCgUUGUA	-----
26	-----	UCUC	GUGUA UCUGGGG	UA GA CU GGAUGCU	-----
12	-----	AUGA	GUGUA UUUGGG	UA GU CU UCGuUGUGG	-----
28	-----	CUGUCGG	GUGUA GUGGG	UA GG CU CCUAUGGAUCC	-----
08	-----		GUGUA UAGGG	UA GU CU UGUGCUUCGUCUUU	-----
29	-----	GUCGGC	GUGUA GUUUUCC	UA AG CU gCUGGC	-----
24	-----	UUUCGC	GUGUA UAUCUAU	UA GG CU GUGGGA	-----
31	-----	U UA GG CU CCGCUUAUAUAGUGG	GUGUA UCA		-----
01	-----	AUGAUUUUAUCGUUGGAAGGUGUUGCGCUGU			-----

図 2-6 in vitro セレクション法により選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットの塩基配列

2-2-3 第一段階機能化により得られた RNP リセプターの評価

in vitro セレクションにより選択された RNP の ATP 結合能を評価するため、ATP 固定化アガロース樹脂を用いた ATP 結合試験を行った。選択された RNA サブユニットから、結合試験に用いる RNA サブユニットは保存配列 5'-GUGUA-UA-CU-3' を有する RNA33 を用いた。まず、RNA33 の Rev ペプチド存在下、非存在下での ATP 結合活性を評価した。その結果、RNA33 は ATP に対して Rev ペプチド依存的な ATP 結合活性を示した (図 2-7)。次に、RNA33 と Rev ペプチドから形成される RNP33/Rev の塩基選択性を評価するため、3 種類の核酸、ATP、UTP (ウリジン三リン酸)、CTP (シチジン三リン酸) を用いた競合試験を行った。その結果、RNP33/Rev は ATP 樹脂との結合が ATP の濃度増加に従って阻害されたが、CTP、UTP では ATP が阻害した濃度範囲で結合阻害は認められなかった (図 2-8)。以上の結果より、RNP33/Rev は、ATP の塩基部分を識別して結合する ATP 結合性 RNP リセプターであることが明らかになった。この RNP33/Rev の Rev ペプチド依存的な ATP 結合挙動及び塩基選択性は、ランダムな 20 塩基配列を導入した RNP ライブラリーから選択された ATP 結合性 RNP リセプターと同様であった¹。そのことから、ランダムな 30 塩基配列を導入して作製した RNP ライブラリーを用いて、今回行った in vitro セレクションにより選択された RNP は、ATP 結合活性を有する分子種に収束していることが明らかになった。

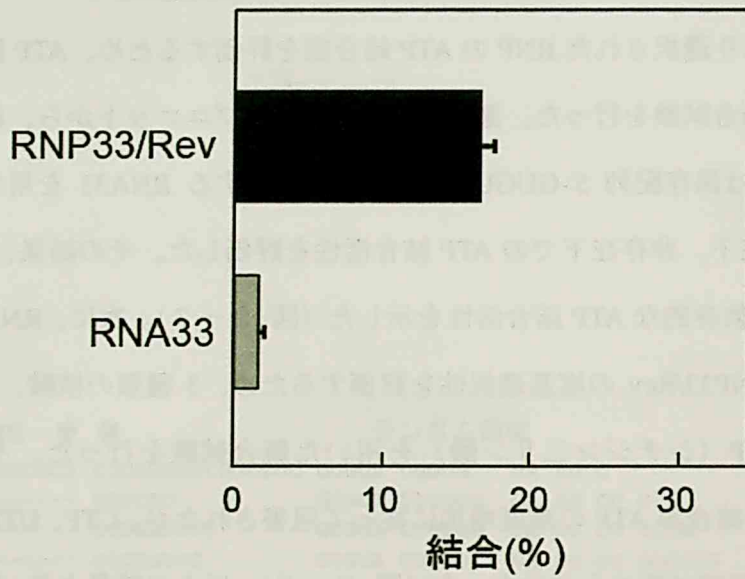


図 2-7 RNA33 の ATP 結合評価

RNA33 の Rev ペプチド存在下 (黒色)、非存在下 (灰色) での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合割合を示す。

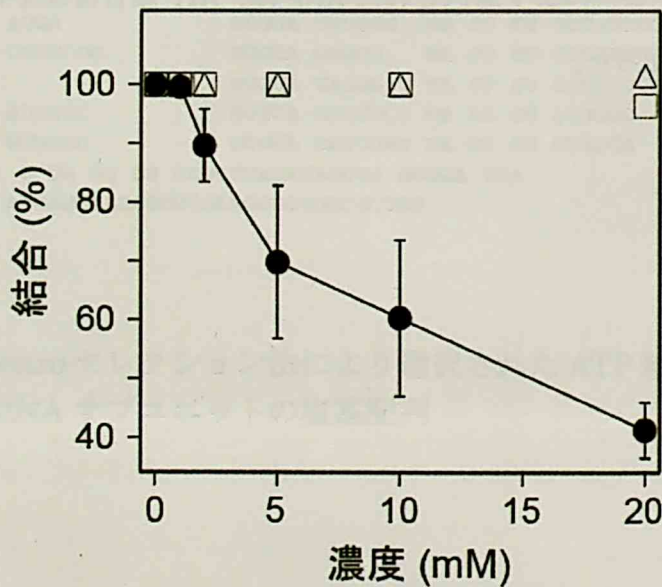


図 2-8 RNP33/Rev 複合体の塩基選択性評価

ATP (黒丸)、UTP (白三角)、CTP (白四角) 競合剤存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を示す。競合剤非存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を 100%としている。

2-3 ペプチドサブユニットの機能化による ATP 結合性 RNP リセプターの高機能化 (第二段階機能化)

2-3-1 ファージディスプレイ法を用いたペプチドライブラリーの作製

第二段階機能化ではペプチドサブユニットの多様化を行った。RRE RNA/Rev ペプチド複合体の三次元構造から、第一段階機能化で得られた ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合場は、Rev ペプチドの N 末端に近接していると予測される (図 2-3)。そこで、Rev ペプチドの N 末端に ATP 認識面としてランダムなアミノ酸により構成されるループ構造⁵を導入することにより、ペプチドサブユニットを多様化した。Rev ペプチドの N 末端にランダムループ構造を導入した LpRev ペプチドライブラリーは、M13 ファージを用いたファージディスプレイ法³により作製した。LpRev ファージペプチドライブラリーは、Rev ペプチド及び、その N 末端にシステインで挟まれたランダムな 7 アミノ酸残基 (Cys-X7-Cys (X はランダムなアミノ酸残基)) で構成されるループペプチドを、ファージタンパク質 pIII と融合した形で表面に提示させることにより作製した (図 2-9)。LpRev ファージペプチドライブラリーは RNA 結合部位及びランダムループを提示していることから、RNA サブユニットと複合体を形成することにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーとなる。

ファージが提示するペプチド配列

CXXXXXXXXCTRQARRNRRRRWRERQR-GGGGS-pIII (X: ランダムなアミノ酸残基)
ランダムループ Rev ペプチド

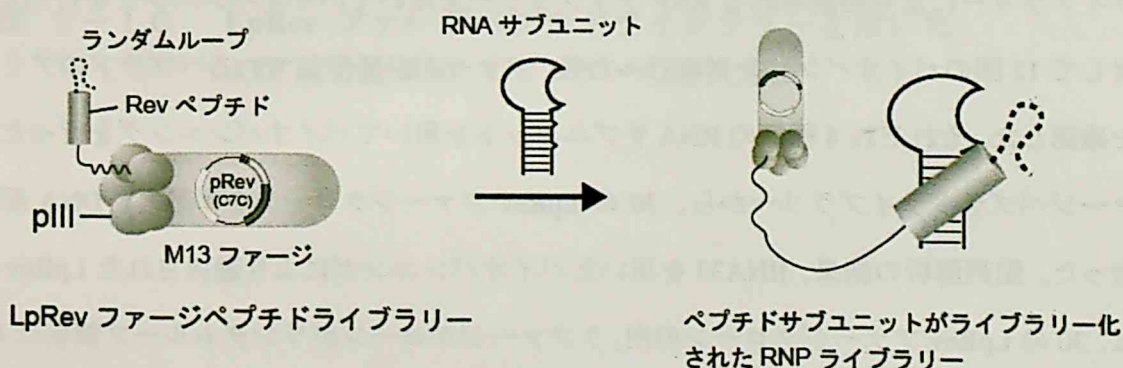


図 2-9 LpRev ファージペプチドライブラリーの設計

2-3-2 フェージディスプレイ法を用いたバイオパンニングによる

ATP 結合性 RNP リセプターの選択

第一段階機能化で選択された ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットを最適化するため、以下に示す方法を用いてバイオパンニングを行った (図 2-10)。まず、LpRev フェージペプチドライブラリーと第一段階機能化で得られた RNA サブユニットの複合体を形成させることにより、ペプチドサブユニットが多様化した RNP ライブラリーを作製した。このライブラリーを ATP 固定化アガロース樹脂に加え、結合反応を行った。結合反応後、非結合の LpRev フェージ/RNA 複合体を除き、非特異的に結合した分子を除くために樹脂をバッファーで十分洗浄した。その後、ATP 樹脂に結合した LpRev フェージ/RNA 複合体は、第一段階機能化と同様に、ATP を競合させることにより特異的に溶出した。溶出した LpRev フェージは宿主大腸菌に感染させ、増幅を行った。増幅したフェージ溶液をポリエチレングリコール沈殿により精製し、次のサイクルの LpRev フェージペプチドライブラリーとした (図 2-10)。この一連の操作を行うことにより、RNA サブユニットと複合体を形成した時に、ペプチドサブユニットのループ構造が ATP に対して最適な結合場を形成する ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。第二段階機能化で用いる RNA サブユニットは、Rev ペプチドの N 末端近傍に ATP 結合場が位置していることが望ましい。しかしながら、第一段階機能化で得られた RNA サブユニットの塩基配列から、Rev ペプチド N 末端に対する ATP 結合場の位置を予測するのは困難であるため、保存配列の存在する位置の異なる RNA08、RNA18、RNA30、RNA33 の 4 種類を第二段階機能化に用いることにした (図 2-6)。これら 4 種類の RNA と LpRev フェージペプチドライブラリーにより形成される RNP ライブラリーを用いてバイオパンニングを行った。ATP に対して 12 回のバイオパンニングを行った後、フェージが提示しているペプチドのアミノ酸配列を確認した。それぞれ 4 種類の RNA サブユニットを用いてバイオパンニングを行った LpRev フェージペプチドライブラリーから、30 の LpRev フェージクローンを単離し、DNA 配列解析を行った。配列解析の結果、RNA33 を用いたバイオパンニングにより選択された LpRev フェージは、30 の LpRev フェージクローンの内、7 フェージクローンがランダムループ領域に Pro-Arg 配列を有していた (図 2-11)。

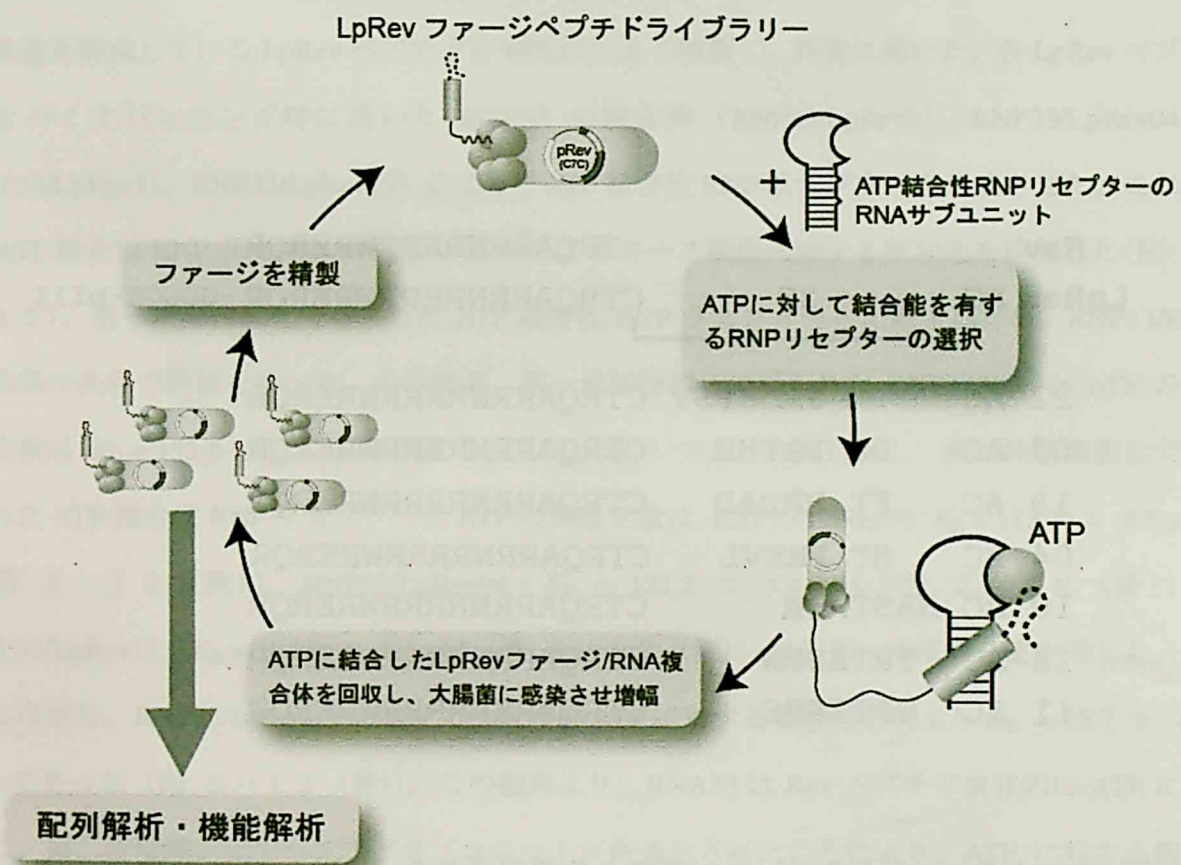


図 2-10 LpRev ファージペプチドライブラリーを用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法

	Rev		TRQARRNRRRRWRERQR
LpRev	AC	X7	CTRQARRNRRRRWRERQR -GGGS-pIII
22	AC	PRSKPSV	CTRQARRNRRRRWRERQR
03	AC	DE PR THE	CTRQARRNRRRRWRERQR
19	AC	FT PR DAD	CTRQARRNRRRRWRERQR
04	AC	ST PRE VL	CTRQARRNRRRRWRERQR
10	AC	HASTA PR	CTRQARRNRRRRWRERQR
18	AC	YRTA PR W	CTRQARRNRRRRWRERQR
11	AC	VPTI PR S	CTRQARRNRRRRWRERQR

図 2-11 バイオパンニングにより選択された **LpRev** フェージが提示していたペプチドのアミノ酸配列

RNA33/LpRev フェージペプチドライブラリーを用いて、ATP に対して 12 回選択を行った後の **LpRev** フェージが提示していたアミノ酸配列

2-3-3 バイオパンニングにより選択された LpRev ペプチドの評価

配列解析結果により明らかになった Pro-Arg 配列を含む LpRev ペプチドの機能評価を行った。まず、各 LpRev ペプチド (LpRev03、LpRev04、LpRev11、LpRev19) を化学合成し、HPLC により精製を行った。精製後の LpRev ペプチドは、ランダム領域の両末端に存在する二つのシステイン同士を分子内でジスルフィド結合を形成させるため、酸化反応を行った。その後、ループ構造を形成している LpRev ペプチドを HPLC により精製し、評価に用いた。各 LpRev ペプチドとバイオパンニング時に用いた RNA33 の複合体 (RNP33/LpRev03、RNP33/LpRev04、RNP33/LpRev11、RNP33/LpRev19) により、ATP 結合性 RNP リセプターを形成させた。これら各 ATP 結合性 RNP リセプターを用いて、ATP アガロース樹脂に対する親和性を評価した (図 2-12)。第一段階機能化で得られた ATP 結合性 RNP リセプターと比較するため、RNP33/Rev も同様の条件で評価を行った。その結果、第一段階機能化で得られた RNP33/Rev と ATP の解離定数は $K_D = 153.6 \pm 11.3 \mu\text{M}$ (図 2-12 (赤)) であったのに対し、第二段階機能化で得られた ATP 結合性 RNP リセプターと ATP の解離定数は、RNP33/LpRev03: $K_D = 113.7 \pm 4.5 \mu\text{M}$ (図 2-12 (黄))、RNP33/LpRev04: $K_D = 121.2 \pm 5.4 \mu\text{M}$ (図 2-12 (緑))、RNP33/LpRev11: $K_D = 164.8 \pm 8.6 \mu\text{M}$ (図 2-12 (紫)) であり、ほぼ同じ値を示した。しかしながら、RNP33/LpRev19 においては約 6 倍 ATP に対する親和性が向上し $K_D = 25.7 \pm 1.9 \mu\text{M}$ であった (図 2-12 (青))。この結果より、RNA33 は Rev ペプチド依存的に ATP に結合し、第二段階機能化でペプチドサブユニットが最適化されたことにより、ATP に対する親和性がさらに向上したことが明らかになった (図 2-13)。これらの結果より、ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 親和性を段階的に向上させることに成功した。以後、LpRev19 の機能について詳しく評価を行った。

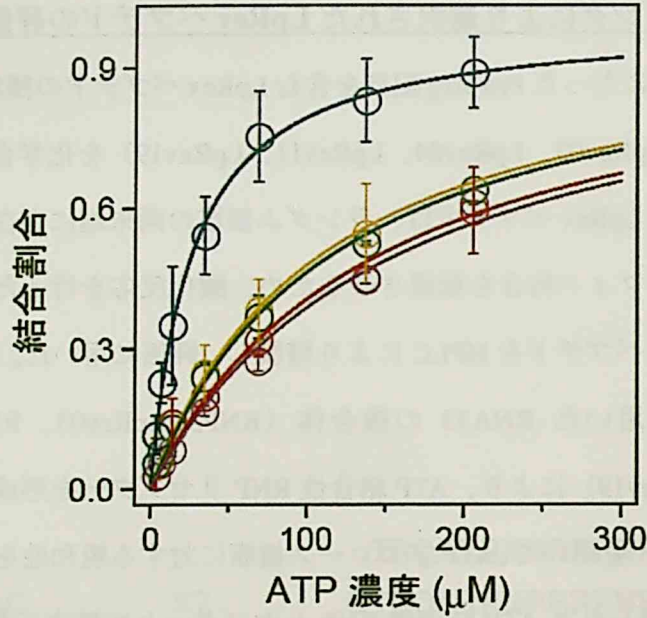


図 2-12 RNP33/LpRev 複合体を用いた ATP 結合試験
各 RNP33/LpRev の ATP 結合飽和曲線を示す。RNP33/LpRev19 (青)、
RNP33/LpRev03 (黄)、RNP33/LpRev04 (緑)、RNP33/LpRev11 (紫)、
RNP33/Rev (赤) で示す。

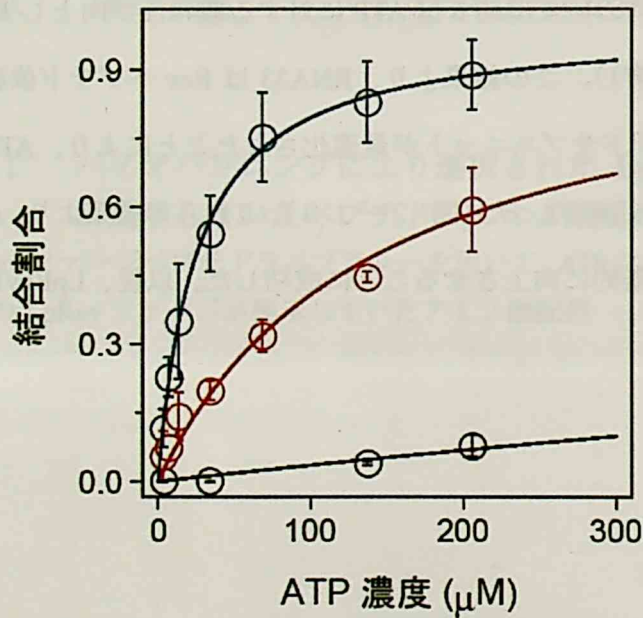


図 2-13 RNP33/LpRev19 複合体を用いた ATP 結合試験
RNA33 (黒)、RNP33/Rev (赤)、RNP33/LpRev19 (青) の ATP 結合飽和曲
線を示す。

2-4 第二段階機能化により得られた ATP 結合性 RNP リセプターの機能評価

2-4-1 ゲルシフト法による RNA33 と LpRev19 の複合体形成確認

RNA33 と Rev ペプチド及び LpRev19 ペプチド間の結合様式をゲルシフト法により解析を行った (図 2-14)。ペプチド濃度の増加に従い、RNA33 と Rev、LpRev19 ペプチド共に複合体を示すバンドの増加が認められた。結合飽和曲線の解析により、RNP33/Rev、RNP33/LpRev19 共に 1:1 で複合体を形成することが明らかになった。また、RNA33 と Rev ペプチドの解離定数は $K_D = 3.4 \pm 0.6 \text{ nM}$ であり、RNA33 と LpRev19 ペプチドの解離定数は $K_D = 15.6 \pm 0.6 \text{ nM}$ であった。この結果は、Rev ペプチドの N 末端にループ構造を導入することで複合体の熱力学的な安定性に影響与えているが、依然として LpRev19 と RNA33 は特異的な 1:1 複合体形成が可能であることを示している。

2-4-2 RNP33/LpRev19 の溶液中の ATP に対する結合試験

RNP33/LpRev19 の溶液中での ATP に対する結合能を評価するため、平衡結合試験を行った。まず、RNP33/LpRev19 に各濃度の ATP を加え結合反応を行った。その後、限外ろ過膜を用いて RNP33/LpRev19 と結合した ATP を膜に吸着させ、非結合の ATP を測定することで結合割合を算出した。結合飽和曲線の解析により、RNP33/LpRev19 と ATP の解離定数は $K_D = 151 \mu\text{M}$ であることが明らかになった (図 2-15)。これは、アガロース樹脂に固定化された ATP を用いて測定した時の解離定数 $K_D = 26 \mu\text{M}$ よりも高い値であった。この結果は、ATP を樹脂に固定化する際の固定化方法が、アデニン環の C-8 位から固定されているためであると考えられる。C-8 位を修飾した ATP は、塩基部とリボース部が *syn* 配向に平衡が偏ることが知られている⁶⁸。この ATP 固定化アガロース樹脂を用いて選択された RNP33/LpRev19 は、*syn* 配向の ATP に対して選択的に結合するリセプターであることが示唆される。一方、溶液中の ATP は *anti* 配向をとりやすいことから、RNP33/LpRev19 と溶液中に存在する ATP の解離定数が、固定化された ATP で測定された解離定数よりも高い値を示すことは適当である。

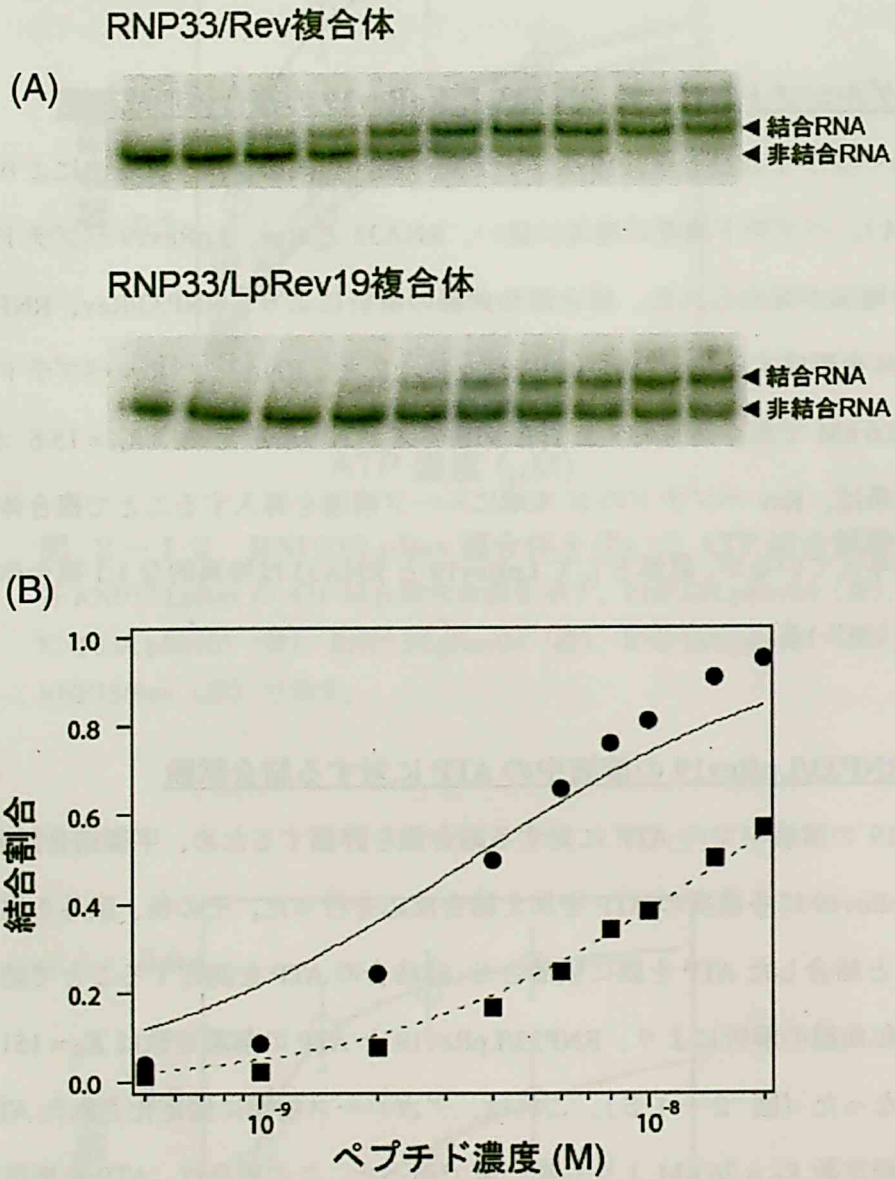


図 2-14 ゲルシフト法を用いた RNP33/LpRev19 の複合体解析

(A) RNA33 に Rev (上図) 及び、LpRev19 (下図) を加えた時のオートラジオグラムを示す。ペプチド濃度は 0、1、2、4、6、8、10、11、12 nM である。

(B) (A) で得られた電気泳動結果から算出した RNA33 と Rev (黒丸) 及び、LpRev19 (黒四角) の結合割合を示す。Rev (実線)、LpRev19 (破線) の RNA33 に対する結合飽和曲線を理論式に基づいて近似した曲線を表示している。

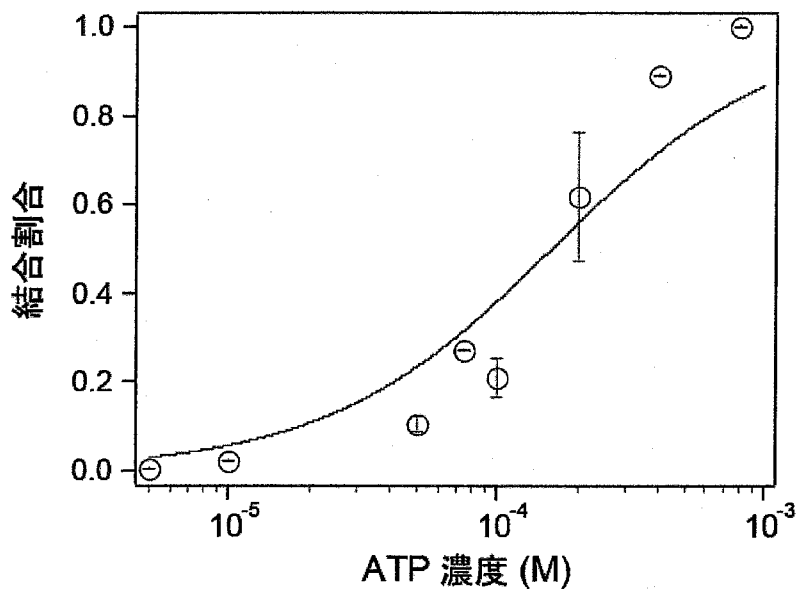


図 2-15 RNA33/LpRev19 複合体を用いた ATP に対する平衡結合試験

RNA33/LpRev19 の平衡結合試験により得られた結果を示す。ATP 結合飽和曲線は理論式に基づいて近似した曲線を表示している。

2-4-3 RNP33/LpRev19 の基質選択性評価 (ATP vs AMP)

第一段階機能化で得られた RNP33/Rev と、第二段階機能化で得られた RNP33/LpRev19 の ATP 選択性を比較するため、ATP 固定化アガロース樹脂を用いた競合試験を行った。まず、ATP のリン酸基に対する分子認識能を評価するため、ATP と AMP (アデノシン一リン酸) を用いた競合試験を行った。その結果、RNP33/Rev、RNP33/LpRev19 共に、ATP 樹脂との結合が ATP の濃度増加に従って阻害されたが、AMP では ATP が阻害した濃度範囲での結合阻害は認められなかった (図 2-16)。この結果より、第一段階機能化で既に RNP33/Rev が保有していた ATP のリン酸基に対する認識能は、第二段階機能化で得られた RNP33/LpRev19 にもその機能が維持されていることが明らかになった。

2-4-4 RNP33/LpRev19 の基質選択性評価 (ATP vs dATP)

続いて、リボース 2'位の OH 基の認識能を評価するため ATP と dATP (デオキシアデノシン三リン酸) を用いた競合試験を行った。その結果、RNP33/Rev は ATP による結合阻害が認められる濃度領域で、dATP も同様の結合阻害を示しているに対して、RNP33/LpRev19 は dATP による結合阻害が認められなかった (図 2-17)。この結果は、第一段階機能化で得られた RNP33/Rev は保有していなかった dATP と ATP を識別する機能が、第二段階機能化で得られた RNP33/LpRev19 にはその機能が付加されたことを示している。つまり、LpRev19 のループ構造が、RNP33/LpRev19 の ATP に対する選択性に寄与していることが明らかになった。次に、LpRev19 が ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 選択性に与える影響が、ループ構造を形成していることに起因しているかを評価した。まず、ループ構造を形成させないようにするため、LpRev19 に存在する 2つの Cys 残基を Ser 残基に変異させたペプチド LpRev19Ser を合成した。この LpRev19Ser と RNA33 の複合体を用いて競合試験を行った結果、RNP33/LpRev19 と比較して、ATP と dATP の識別能の低下が確認された (図 2-17)。この結果より、LpRev19 はループ構造を形成することによって、ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 選択性を向上させていることが明らかになった。

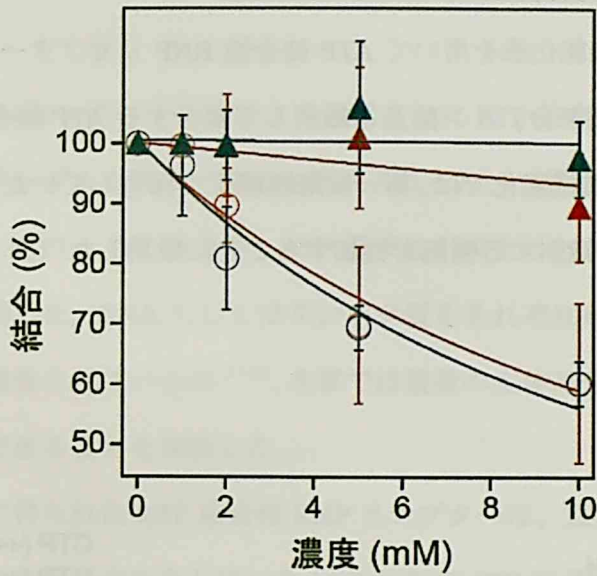


図 2-16 RNP33/LpRev19 複合体の基質選択性評価 (ATP vs AMP)
 RNP33/Rev (赤) と RNP33/LpRev19 (青) の、ATP (丸)、AMP (三角) 存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を示す。競合剤非存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を 100%としている。

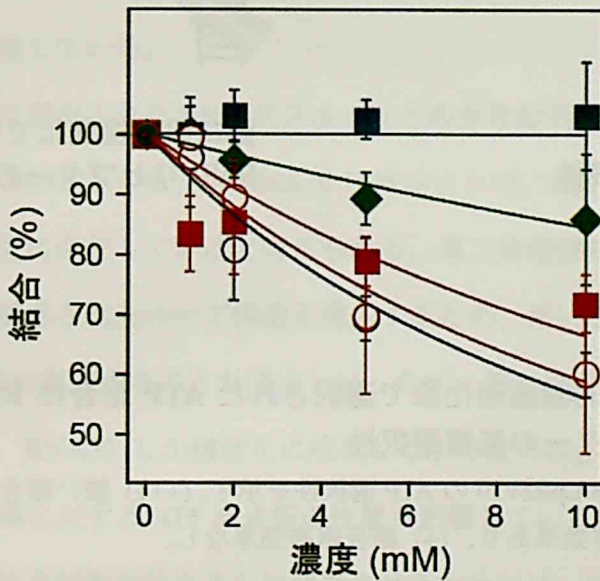


図 2-17 RNP33/LpRev19 複合体の基質選択性評価 (ATP vs dATP)
 RNP33/Rev (赤)、RNP33/LpRev19 (青)、RNP33/LpRev19Ser (緑菱形) の、ATP (丸)、dATP (四角) 存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を示す。競合剤非存在下での ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合%を 100%としている。

2-4-5 RNP33/LpRev19 の基質選択性評価まとめ

RNP リセプターの段階的高機能化法を用いて ATP 結合性 RNP リセプターを作製した結果、第一段階機能化では ATP の塩基部分、リン酸基を識別して結合する ATP 結合性 RNP リセプターを得ることができた。第二段階機能化では、第一段階機能化で保有していた選択性を維持し、新たにリボース 2'位の OH 基を識別する機能を付加することに成功した (図 2-18)。

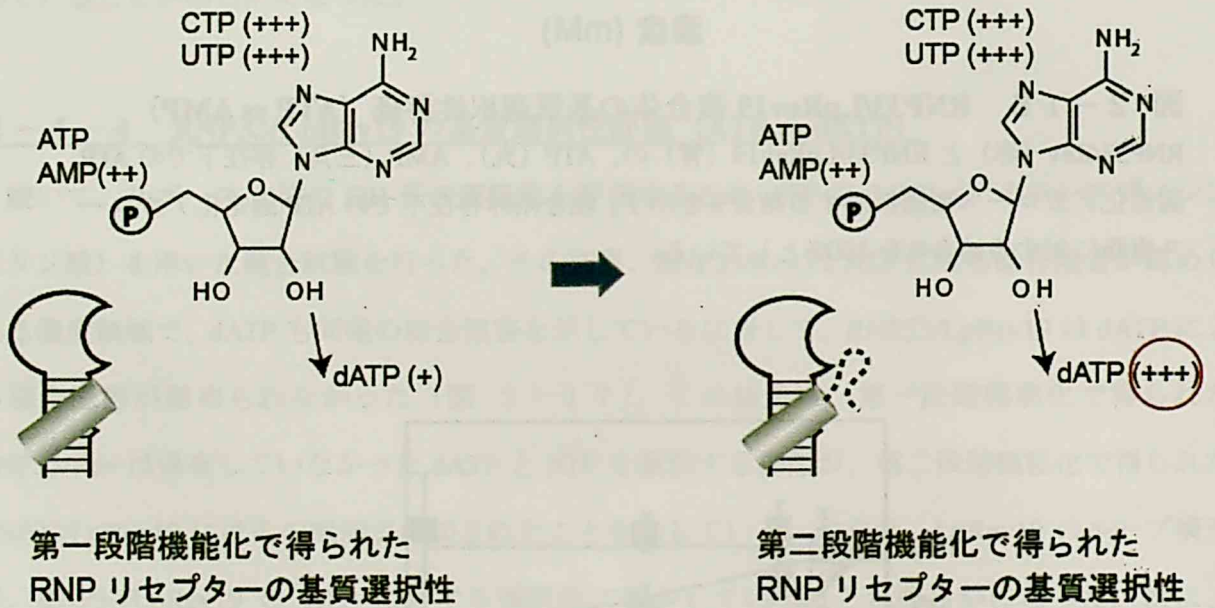


図 2-18 段階的機能進化法で選択された ATP 結合性 RNP リセプターの基質選択性

RNP33/Rev 及び RNP33/LpRev19 の ATP 選択性を示す。(+++) 強い結合阻害効果あり、(++) 結合阻害効果あり、(+) 結合阻害効果なし。

考察

本章では、*in vitro* セレクション法により選択された ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに、ランダムなアミノ酸から構成されるループ構造を導入し、新たに ATP に対して選択を行うことにより、ATP 結合能、ATP 選択性が向上した ATP 結合性 RNP リセプターを選択することに成功した。RNA もしくはタンパク質をそれぞれ単独で用いてリセプターを作製する方法は数多く報告されているが¹⁷⁻²⁹、本章では複数の生体高分子サブユニットから高機能なリセプターが作製できることを実証した。

第一段階機能化で得られた ATP 結合性 RNP リセプターは、以前選択された ATP 結合性 RNP リセプターと同様の保存配列を有していた¹。これらの ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合様式は、Rev ペプチド依存的な ATP 結合、塩基選択性から、以前得られた ATP 結合性 RNP リセプター¹と同様であると考えられる。しかしながら、ランダム領域が 30 塩基配列で構成される RNP ライブラリーから今回選択した ATP 結合性 RNP リセプターは、以前の RNP リセプターには存在しなかった ATP のリン酸基を識別する機能が付加されていた。この結果は、ランダム領域を構成する塩基配列の長さを変えることで、さらなる高機能な RNP リセプターの作製が可能であることを示唆している。

第一段階機能化で選択された RNA サブユニットの保存配列は、ランダム領域内の多様な位置に存在していた。このことから、各 RNA サブユニットで、ATP 結合場が Rev ペプチド N 末端に対して異なる位置に存在していると考えられる。第二段階機能化では、Rev ペプチド N 末端にアミノ酸により構成されるループ構造を導入するため、用いる RNA サブユニットは ATP 結合場が N 末端近傍に存在することが望ましい。今回、第二段階機能化で用いた 4 種類の RNA サブユニットの内、RNA33 しか機能化に成功しなかったのは、RNA サブユニットが形成する Rev ペプチド N 末端に対する ATP 結合場の位置が影響している可能性がある。したがって、RNP リセプターの段階的高機能化法をさらに発展させるためには、Rev ペプチド N 末端近傍に ATP 結合場が存在する RNA サブユニットを選択する方法論が望まれる。

第二段階機能化で選択された ATP 結合性 RNP リセプター RNP33/LpRev19 は、RNP33/Rev と比較して ATP 親和性が向上し、ATP と dATP を識別する機能が付加されていた。本章の第二段

階機能化で選択された LpRev ペプチドは、保存配列として Pro-Arg 配列を含んでいたが、RNP リセプターを形成した際に機能を発揮したのは LpRev19 だけであった。この原因を解明するためには、アミノ酸変異導入または三次元構造解析などにより、LpRev19 のループ構造を構成している各アミノ酸が ATP 結合に与える影響を詳細に解析し、Pro-Arg 配列が担っている役割を明らかにする必要がある。

ATP 結合性 RNP リセプターの段階的高機能化法を応用し、今回選択されたアデニン部分を識別して結合する RNA サブユニットを用いて、S-アデノシルメチオニン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) などのアデノシン誘導体を基質分子とすることで、ATP 結合性 RNP リセプターから、基質選択性が拡張された RNP リセプターを作製することが可能であると考えられる。

多様化した生体高分子から目的とする機能を有するリセプターを選択する方法論においては、初期ライブラリーの多様性が重要である。RNP の各サブユニットを独立にライブラリー化したときの多様性は、30 塩基をライブラリー化した RNA サブユニットでは 10^{18} であり、7 アミノ酸をライブラリー化したペプチドサブユニットでは 10^9 である。これらのサブユニットを組み合わせ RNP ライブラリーとすることで 10^{27} の多様性を有するライブラリーを構築できる。このような大きなサイズの多様性を有する生体高分子ライブラリーを扱うことができる方法論は他に類はなく、本方法論のような異なる生体高分子から形成されるライブラリーを用いる方法は、高機能な生体高分子リセプターを作製できる可能性が高いと考えられる。また、本方法論の設計では両サブユニットを同時にライブラリー化した RNP ライブラリーの構築と、そのライブラリーからの機能性 RNP の選択も可能である。このような、両サブユニットが基質分子に対して同時に最適化できる方法論も非常に興味深い。

結論

第一段階機能化では、既に表示されている方法論に従い、ランダムな 30 塩基配列を導入した RNP ライブラリーから、*in vitro* セレクション法を適用して ATP 結合性 RNP リセプターを選択した。選択された RNA サブユニットは、ランダムな 20 塩基配列を導入した RNP ライブラリーを用いて作製された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと同様の保存配列を有していた。選択された RNA33 は Rev ペプチド依存的に ATP に結合し、RNP33/Rev は ATP の塩基部分及びリン酸基を認識する ATP 結合性 RNP リセプターが得られた。第二段階機能化では、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットにループ構造を導入し、ループ構造を構成する 7 アミノ酸をフェージディスプレイ法により多様化した。第一段階機能化で得られた RNA33 と多様化したペプチドサブユニットにより構成される RNP ライブラリーから、新たに ATP に対して結合する RNP を選択した結果、ループ構造を形成するアミノ酸に Pro-Arg 配列を保存配列とするペプチドサブユニットを得た。第二段階機能化で得られた LpRev19 ペプチドと RNA33 の複合体により構成される RNA33/LpRev19 は、第一段階機能化で選択された RNA33/Rev の ATP 選択性は維持し、新たに dATP と ATP を識別する高機能な ATP 結合性 RNP リセプターであった。また、LpRev19 のループ構造形成が ATP 選択性に寄与していることを明らかにした。以上の結果より、RNP を基本骨格として ATP に対して両サブユニットを順次最適化することにより、ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 親和性、ATP 選択性を段階的に向上させることに成功した。

実験の部

試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸は Novabiochem 社から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂、HATU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) は Applied Biosystems 社から、ペプチド合成用 DMF は和光純薬から購入した。ATP 固定化アガロース樹脂、ヌクレオチド (ATP、AMP、dATP、UTP、CTP) は Sigma-Aldrich 社から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI)、T4 RNA リガーゼは New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素 (AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase) は Promega 社から購入した。RNA 転写キット (Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit) は Epicentre 社から購入した。Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar は Difco 社より購入した。オリゴ DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。放射性アイソトープは Amersham Pharmacia 社から購入した。QIAprep Spin Mini Prep Kit、QIAGEN Nucleotide Removal Kit は Qiagen 社から購入した。スピンカラム SUPREC-01 は TaKaRa 社から購入した。ファージミドベクター pSurfscrip SK(-) phagemid は Invitrogen 社から購入した。VCSM13 ヘルパーファージは Stratagene 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

用いた DNA プライマーの配列

N はランダムな核酸塩基、M は A もしくは C、アンダーラインは相補的な塩基、小文字表記は *Eco*RI 認識配列と *Bam*HI 認識配列を表している。

RRE N30 : 5'-GGAATAGGTCTGGGCGCA(N₃₀)TGACGGTACAGGCCGAAAG-3'

REV 01 プライマー : 5'-CTTTCGGCCTGTACCGTCA-3'

FOR 01 プライマー : 5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAATAGGTCTGGGCGCA-3'

FOR 02 プライマー : 5'-CGgaattcTAATAC-GACTCACTATAGG-3'

REV 02 プライマー : 5'-GCGgatccTTTTCGGCCTGTACCGTCA-3'

FOR 03 プライマー : 5'-GAATTCTAATACGACTCACTATAGG-3'

M13 RV プライマー : 5'-CAGGAA-ACAGCTATGAC-3'

T7 Promotor プライマー : 5'-GTAATACGACTATAGGGC-3'

5'-DNA プライマー : 5'-CTCGCTCGCCCATATGCGGCCGCAGGTCTCC-3'

3'-DNA プライマー : 5'-CCATGGGCGCGCTTGTCAAGTGC-3'

C7CRev F プライマー : 5'-CCA TGG GCG CGC TTG TCT AGT GCA MNN MNN MNN MNN MNN
MNN MNN ACA AGC GGC CAT TGC TGG TTG-3'

C7CRev R プライマー : 5'-CTC GCT CGC CCA TAT GCG GCC GCA GGT CTC CTC CTC TTA GCA
GCA CAA CCA GCA ATG GCC GCT TGT-3'

PCR の条件

PCR は BIO-RAD 社 iCycler Thermal Cycler あるいは TaKaRa 社 PCR Thermal Cycler PERSONAL を用い、標準的な PCR 反応は、TaKaRa 社の Pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて、添付の Pyrobest Buffer II 反応液中 0.2 mM のプライマー-DNA を用い、0.2 mM の dNTP の条件で行った。

DNA ライブラリーの作製

30 塩基のランダムな塩基配列を含む鋳型 DNA (RRE N30) に、RRE N30 の 3'末端領域に相補的な REV 01 プライマーを 99℃から室温まで 2 時間かけてアニーリングさせた。Klenow DNA ポリメラーゼを用いて 25℃、15 分間の伸長反応を行うことにより、2 本鎖 DNA を合成した。続いて、T7 プロモーターを含む FOR 01 プライマー、REV 01 プライマーを用いて、変性 94 °C、30 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分の条件により、4 サイクル PCR 反応を行うことで、ランダムな 30 塩基を含む 2 本鎖の DNA ライブラリーを構築した。

RNA ライブラリーの作製

1 µg の 2 本鎖 DNA を鋳型として、Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit を用いて 20 µl の容量で 37 °C で 3 時間転写反応を行った。転写反応終了後、1 U の DNase I を加え 37 °C で 15

分間反応を行い、鋳型 DNA を分解した。転写した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿により精製した。RNA サンプルは、80 %ホルムアミド水溶液に溶解し、80 °Cで5分間の熱処理を行った後、氷上で急冷して変性させ、6 M 尿素を含んだ8 %ポリアクリルアミド変性ゲルにより精製した。TLC 板上で UV 光を照射し、目的分子量の RNA のバンドを確認した上で切り出しを行った。目的 RNA を含んだ切り出し後のゲル断片を細かく破砕し、TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA) を加え、4 °C、12 時間抽出した。抽出した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い精製した。精製した RNA は 10 μ M となるように 10 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl を含んだバッファーで希釈し、80 °Cで3分加熱後した後、室温まで2時間かけて温度を下げることにより、適切な二次構造を形成させた。

Rev ペプチドの合成

Rev ペプチドは Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.41 mmol/g)を 0.05 g 用いた。縮合は、樹脂に対して5当量の Fmoc アミノ酸、5当量の HATU を5%のジイソプロピルエチルアミンを含む DMF に溶解したものに加え、60分攪拌することで行った。ペプチドの N 末端の Fmoc 基を除去した後、5当量の *N*-アセチルイミダゾールを用いてペプチドの N 末端をアセチル化した。樹脂からの切り出しおよび側鎖の脱保護は、氷上、窒素雰囲気下にて 0.75 g フェノール、0.5 ml チオアニソール、0.25 ml エタンジチオール、0.5 ml 水、10 ml トリフルオロ酢酸の混合溶液を、乾燥させた樹脂に加え、窒素雰囲気下、氷上にて6時間攪拌することにより行った。反応終了後、樹脂を濾別した反応溶液に、氷上にて水、エーテルを加え激しく攪拌した後、水相を回収した。この操作を3回行った。エーテルで抽出精製した水相をエバポレーターにより溶媒を減圧留去し、5%酢酸水溶液で溶解した。その後、5%酢酸水溶液を溶離液としてゲルろ過 (Sephadex G-10) 精製を行った後、逆相 HPLC により精製した (溶離液 A 0.2%トリフルオロ酢酸水溶液、溶離液 B 0.2%トリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル水溶液)。ペプチドの同定には Voyager MALDI-TOF マススペクトル (Applied Biosystems) を用いた。

ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法

結合試験には 4 % beaded アガロース固定された ATP 樹脂 (2.3 mmol ATP/ μ l 樹脂容量、ATP の C8 位からリンカーを介して樹脂に固定化) を用いた。樹脂はあらかじめ、樹脂容量の 3 倍量の結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂) で 3 回洗浄することにより平衡化した。50 μ l 容量の ATP 樹脂と、10 μ M の RNA、15 μ M Ac-Rev ペプチド混合液 100 μ l をスピンカラム SUPREC-01 に加え、氷上で 30 分間結合反応を行った。結合反応後、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) を行い、非結合画分を除去した。結合反応後の樹脂に、300 μ l の結合バッファーを加え攪拌し、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) する操作を 3 回繰り返して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNA は 4 mM ATP を含んだ結合バッファー 100 μ l で溶出させ、これを 3 回繰り返した。回収した溶液は酢酸アンモニウム存在下エタノール沈殿を行い、RNA を回収した。回収した RNA は 10 μ l TE (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA) に溶解した。3 μ l の RNA を鋳型として、5 μ M の REV 01 プライマー存在下、80 °C 3 分間加熱後、30 分間かけて 25 °C まで徐冷しアニーリングさせた。その後、逆転写酵素及び dNTP を加え、42 °C、30 分間逆転写反応を行った。反応液を 99 °C、5 分間加熱処理し逆転写酵素を失活させた後、反応液の 1/10 量について REV 01、FOR 01 プライマーを用いて、変性 (94 °C、30 秒間)、アニーリング (55 °C、30 秒間)、伸長反応 (72 °C、1 分間) の条件で PCR 反応を行った。30 サイクルまで 5 サイクル毎に反応液を分取し、8 %ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1) 電気泳動により増幅 DNA を分析した。分析結果から、指数的に DNA の増幅が確認される最小のサイクル数で PCR 反応を行い、新たな DNA ライブラリーを調製した。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下、2-プロパノール沈殿により精製し、次のセレクションの DNA ライブラリーとして用いた。

選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA 配列解析

選択を行った DNA ライブラリーについて、制限酵素の切断領域を付加するために、制限酵素切断領域を有する FOR 02 プライマー、REV 02 プライマーを用いて PCR を行った。PCR は 100 μ l の反応容量で鋳型 DNA 100 ng を用いて変性 (94 °C、30 秒間)、アニーリング (55 °C、30 秒間)、伸長反応 (72 °C、1 分間) の条件で 4 サイクル行った。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製した。精製後の DNA は *Bam*HI、*Eco*RI により 37 °C

で3時間酵素反応を行った。酵素消化後、フェノール/クロロホルム処理を行い、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿により精製し、インサート DNA を作製した。予め制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI により切断した pUC19 プラスミド DNA に対し、3 倍モル量のインサート DNA を加え、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 溶液を加え、16 °C、1 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーションサンプルを DH5 α コンピテントセルに形質転換し、アンピシリンを含む LB プレート培地上で一晩静置培養した。プレート培地上の各シングルコロニーを 5ml のアンピシリンを含んだ液体 LB に植菌し、37°C で 16 時間培養した。培養後の大腸菌から Qiagen Mini Prep Kit を用いてアルカリ法によりプラスミド DNA を抽出した。200 ng プラスミド DNA、1.6 pmol M13 RV プライマー、Big Dye Terminator プレミックス液 4 μ l を反応容量 10 μ l となるように混合し、変性 (96 °C、30 秒間)、アニーリング (50 °C、15 秒間)、伸長反応 (60 °C、4 分間) の条件で 25 サイクル反応を行った。反応終了後の DNA サンプルは、酢酸ナトリウム溶液存在下エタノール沈殿により精製した。精製後の DNA は 3 μ l のシークエンス用ローディング溶液に溶解させ、99 °C で 2 分間熱処理した後、氷上で急冷し、配列解析用の DNA サンプルとした。DNA 配列解析は Applied Biosystems 社の自動 DNA 配列解析装置 (ABI Model 377) を使用した。

配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製

配列確認を行ったプラスミド DNA 10 ng を鋳型 DNA として、FOR 03 プライマー、REV 01 プライマーを用いて、全量 100 μ l の PCR 反応溶液を作製した。PCR は、変性 (94 °C、30 秒間)、アニーリング (55 °C、30 秒間)、伸長反応 (72 °C、1 分間) で 30 サイクル反応を行った。PCR 産物は酢酸アンモニウム存在下 2-プロパノール沈殿を行った。精製した DNA は TE 緩衝液に溶解し、前述した方法により転写反応を行った後、8 %ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて精製した。

RNA の 5'末端標識

[γ -³²P] ATP (5000 mCi/mmol) と T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて 37°C で 1 時間、RNA の 5'末端の標識反応を行った後、6 M 尿素を含んだ 8 %変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1) により精製した。切り出したゲルを細かく破碎し、TE 緩衝

液中にて 4 °C、12 時間かけて RNA を溶出させた。抽出した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い精製した。

RNP33/Rev の ATP 結合試験

樹脂量として 50 μ l 容量の ATP-アガロース樹脂、RNA (最終濃度 10 μ M) と Rev ペプチド (最終濃度 15 μ M) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂) を SUPREC 01 に加え、氷上 30 分間反応させた。反応液を遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) によりろ過した。樹脂に 300 μ l の結合バッファーを加え攪拌した後、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) することにより溶液を除去した。この操作を 3 回繰り返して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNA は、4 mM ATP を含んだバッファー 100 μ l で 10 分間インキュベートした後、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) により溶液を回収した。この操作を 3 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分 (%)、特異的結合画分 (%)、非特異的結合画分 (%) を算出した。データは平均±標準偏差により表記した。

競合試験による RNP33/Rev の塩基選択性評価

樹脂量 50 μ l の ATP-アガロース樹脂に、RNA (最終濃度 10 μ M)、Rev ペプチド (最終濃度 15 μ M) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂) 中、各濃度の競合物質を加えて氷上 30 分間反応させた。以下、ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合試験方法に従った。

precursor phagemid (pRev) の作製

ファージミドベクター である pSurfscrip SK(-) phagemid に Rev ペプチドをコードする DNA (Rev DNA) を導入した。Rev DNA は Not I/Spe I サイトを持つプライマーを用いて PCR 法により作製した。得られた Rev DNA は制限酵素 Not I/Spe I 処理後、同制限酵素により調整したファージミドベクターに導入した。得られた precursor phagemid (pRev) は DNA 配列解析装置により

配列を確認した。

ランダムカセットの作製

Rev ペプチドの N 末端にランダムループを導入するため、ベクター由来のリーダー配列および Rev ペプチドの N 末端配列を含むランダムカセットを作製した。ランダムカセットはランダムな 7 アミノ酸に相当する配列を含むプライマー (C7CRev F) と相補配列を含むプライマー (C7CRev R) を、それぞれ 5 μ M の濃度でアニール後、Klenow ポリメラーゼにより 25 $^{\circ}$ C、20 分間反応させることにより作製した。

ファージミド pRev (C7C)の作製

ファージミド pRev (C7C)を作製するため、pRev を Not I/BssH II による処理後、1%アガロースゲルにより切り出し精製を行った。切り出したゲル断片から、エレクトロエリユーションにより目的 DNA を回収した。ランダムカセット(C7C)は Not I/BssH II による処理後、QIAGEN Nucleotide Removal Kit により回収・精製した。精製後 pRev ベクターおよびランダムカセット (C7C)をモル比率 1:5 で混合し、Takara Ligation Kit ver.2 を用いてライゲーション反応を行い、ファージミド pRev (C7C)を作製した。

VCSM13 ヘルパーファージの調整

組換えファージミドの切り出し (in vivo excision) のために必要な VCSM13 ヘルパーファージの調整を行った。まず 400 ml の LB 培地 (20 μ g/ml テトラサイクリン) に宿主大腸菌 XL1-BLUE を植菌し、O. D. 600 nm の値が 0.3 になるまで培養した。次に、multiplicity of infection (MOI)大腸菌 : ファージ=20:1 相当の VCSM13 ヘルパーファージを感染し、37 $^{\circ}$ C、30 分培養した。更に終濃度 25 μ g/ml のカナマイシンを加え、8 時間培養した。得られた培養液は 65 $^{\circ}$ C、15 分間の熱処理後、遠心分離 (8,000 rpm, 15 分間) により沈殿物を除き、VCSM13 ヘルパーファージを回収した。VCSM13 ヘルパーファージはタイター測定の結果、 1.73×10^{12} pfu/mL (pfu; plaque forming unit)であった。

形質転換および in vivo excision

pRev-C7C を、エレクトロポレーション法を用いて SOLR cell に形質転換した。形質転換は 10 μg の pRev-C7C あたり 200 ml 培養分のエレクトロコンピテントセルを使用し、20 回のエレクトロポレーションにより調整した。エレクトロポレーションは 0.2 cm を使用し、2.5 kV、capacitor 25 μF で行った (平均時間 5 msec)。得られた形質転換体は速やかに SOC 培地に懸濁し、1 時間 37°C で静置培養後、400 ml の LB 培地(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン, 10 mM MgSO_4 含む)により 2 時間培養した。続けて、予め調整した VCSM13 ヘルパーファージを共感染 (大腸菌とヘルパーファージの比 MOI=1:10) させ、O. D. 600 nm の値が 1.0 を越えるまで約 5 時間培養した。得られた培養液を遠心分離 (6,000 g、20 分間) し、その上清を LpRev ファージペプチドライブラリーとした。

ファージミドの濃縮・精製

ファージミドは RNase 除去 (精製) および濃縮を目的としてポリエチレングリコール (PEG) 沈殿を行った。100 ml の LpRev ファージペプチドライブラリーに 30% PEG - 2.5 M NaCl 溶液を 1/6 量加え、遠心分離 (10,000 g、10 分間) した。得られた沈殿物に 5 ml を milliQ 水に溶解後、1 ml の 30% PEG - 2.5 M NaCl 溶液を加え、15 分間静置後、遠心分離 (10,000 g、10 分間) した。更に得られた沈殿物は 1 ml の milliQ 水に溶解後、200 μL の 30% PEG - 2.5 M NaCl 溶液を加え、15 分間静置後、遠心分離 (10,000 g、10 分間) した。遠心上清を除去後、500 μl の結合試験に用いるバッファーに溶解した。得られた LpRev ファージライブラリーは遠心分離 (17,400 g, 20 min., 4°C) し、不溶性の沈殿物を除去後、結合試験に用いた。

RNA/LpRev ファージライブラリーを用いたバイオパンニング

1 μM RNA、 $\sim 2 \times 10^{11}$ pfu の LpRev ファージライブラリーを含む結合反応溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、5 mM MgCl_2) 100 μl を、50 μl の ATP 樹脂に加え氷上で 30 分間インキュベートすることにより結合反応を行った。その後、非結合または非特異的に結合した RNA/LpRev ファージ複合体を除くため、300 μl の結合バッファーを加え樹脂を攪拌後、溶液を除く操作を 8 回繰り返した。結合した RNA/LpRev ファージ複合体を回収するために、150 μl

の 4mM ATP を含む結合バッファーを加え室温下 10 分間インキュベートした後、溶液を回収する操作を 3 回行った。回収した溶液は大腸菌 SOLR に感染させることにより増幅を行った。増幅した LpRev ファージライブラリー溶液は PEG 沈殿により精製し、次のサイクルの LpRev ファージライブラリーとした。

LpRev ファージライブラリーは 8 サイクルのバイオパンニング終了後に再構築を行った。8 サイクル目のバイオパンニングで得られた LpRev ファージライブラリーを SOLR cell に感染させ、100 ml LB 培地にて培養を行った。培養した大腸菌からアルカリ-SDS 法によりファージミド DNA を回収した。回収した DNA を鋳型としてランダム領域の DNA を 5'-DNA プライマーと 3'-DNA プライマーを用いて、Pyrobest DNA ポリメラーゼにより PCR 反応を行い増幅した。作製した DNA フラグメントを制限酵素 Not I /BssH II により切断し、ランダムカセット (C7C) 導入方法に従い再び LpRev ファージライブラリーを作製した。再構築した LpRev ファージライブラリーを用いて上に示した方法で再度バイオパンニングを行った。

DNA 配列解析による提示ペプチド配列の確認

バイオパンニング後、タイター測定を行った LB プレート上のシングルコロニーをピックアップし、T7 Promotor プライマーと M13 RV プライマーを用いて、コロニーPCR 法によりインサート DNA の増幅を行った。以下の操作は、上述した方法に従った。

LpRev ペプチドの合成

LpRev ペプチドは Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin 用いた。樹脂に対して 5 当量の Fmoc アミノ酸、5 当量の HATU、5 % のジイソプロピルエチルアミンを含む DMF に加え、60 分攪拌することで縮合反応を行った。樹脂からの切り出しおよび側鎖の脱保護は、氷上、窒素雰囲気下にてフェノール (0.75 g)、チオアニソール (0.5 ml)、エタンジチオール (0.25 ml)、水 (0.5 ml)、トリフルオロ酢酸 (10 ml) の混合溶液を、乾燥させた樹脂に加え、窒素雰囲気下、氷上にて 6 時間攪拌することにより行った。反応終了後、樹脂を濾別した反応溶液に、氷上にてエーテルを加え激しく攪拌した後、遠心分離により沈殿を回収した。この操作を 3 回行い、沈殿を 5 % 酢酸水溶液で溶解した。その後、5 % 酢酸水溶液を溶離液とし

てゲルろ過 (Sephadex G-10) 精製を行った後、逆相 HPLC により精製した (溶離液 A 0.2 % トリフルオロ酢酸水溶液、溶離液 B 0.2 % トリフルオロ酢酸を含む 50 % アセトニトリル水溶液)。ペプチドの同定には Voyager MALDI-TOF マススペクトル (Applied Biosystems) を用いた。精製後のペプチドが終濃度 10 μ M となるように Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝溶液で希釈し、スターラーで一晩攪拌させることにより空気酸化反応を行った。酸化反応後、HPLC により精製を行った。

ATP 固定化アガロース樹脂の有効濃度算出

ATP が固定化された樹脂を含む結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、10 mM KCl、10 mM MgCl₂) 中、放射標識した RNA33 を、結合が飽和に達するまで結合させた。1 分子の ATP に対して 1 分子の RNA が結合すると仮定して、樹脂に固定化された ATP の有効基質濃度を算出した。その結果、有効 ATP 濃度は 256.1 \pm 20 nmol/ml であった。

RNA/LpRev 複合体を用いた ATP 結合試験

各樹脂量の ATP 固定化アガロース樹脂に RNA (最終濃度 1 μ M) とペプチド (最終濃度 1 μ M) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、50 μ g/ml tRNA、0.005 % Tween 20) 中で、室温下 30 分間反応させた。反応液を遠心分離 (1,000 g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) によりろ過した。樹脂に 300 μ l の結合バッファーを加え攪拌後、遠心分離 (1,000 g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) した。この操作を 3 回繰り返して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNP は、10 mM ATP を含んだバッファー 100 μ l を加え、10 分間反応させた後、遠心分離 (1,000 g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) により溶液を回収した。この操作を 3 回繰り返して、樹脂に結合した RNP を回収した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分 (%)、特異的結合画分 (%)、非特異的結合画分 (%) を算出した。データは平均 \pm 標準偏差により表記した。RNP リセプターの ATP との解離定数 K_D は、以下の理論式[1]に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$f = \frac{[ATP]}{[ATP] + K_D} \quad [1]$$

f は ATP に結合した RNP の結合割合、[ATP] は ATP 濃度を示す。

ゲルシフト法による RNA、ペプチド複合体の解析

終濃度 20 pM の 5' 末端を RI 標識した RNA を含む結合溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、6 % スクロース、0.005 % Tween 20) に、様々な濃度の Rev ペプチドもしくは LpRev ペプチドを加え、全量 20 μl とした溶液を 4 °C にて 30 分間反応させた。反応溶液のうち 8 μl を、100 V で 60 分以上予めプレランした 8 % 非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド : ビスアクリルアミド = 29 : 1) にロードし、100 V、4 °C で電気泳動を行った。電気泳動は、ATTO 社の AE-6410 ゲルボックスで行い、泳動温度は、水-メタノール混合液の循環による温度コントローラーによって制御した。泳動後のゲルを、BIO-RAD 社の Model 583 ゲルドライヤーで乾燥した後、STORM (Amersham Pharmacia 社) を用いて可視化した。データの解析には Image Quant (Molecular Dynamics 社) を用いた。

RNP33/LpRev19 を用いた平衡結合試験

18 μM RNA 33/LpRev 19 を結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、10 mM KCl、10 mM MgCl₂) 中、各濃度の ATP ([γ-³²P] ATP (5000 mCi/mmol) を含む) を加え、サンプル溶液を氷上で 30 分間結合反応を行った。サンプル溶液 50 μl を限外ろ過膜 : ULTRAFREE-MC Mw.5000cut (MILLIPORE 社) に加え、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) を行い、上清を破棄した。その後、再び遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) を行い、上清 10 μl を回収した。回収した溶液とサンプル溶液それぞれ 10 μl の放射活性を測定することにより RNP33/LpRev の ATP 結合割合を算出した。ATP との解離定数 K_d は、理論式 [2] に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$f = \frac{[RNP] + [ATP]}{[RNP]_T}$$

$$= \frac{([RNP]_T + [ATP]_T + K_D) / 2 - \sqrt{([RNP]_T + [ATP]_T + K_D)^2 - 4[RNP]_T[ATP]_T}}{2[RNP]_T} \quad [2]$$

f は ATP に結合した RNP の結合割合、[] は濃度、[RNP]_T は全 RNP 濃度、[ATP]_T は全 ATP 濃度を示す。

RNP33/Rev、RNP33/LpRev19 を用いた競合試験

樹脂量として 50 μ l の ATP 固定化アガロース樹脂に 5' 末端を RI 標識した RNA (最終濃度 1 μ M) とペプチド (最終濃度 1.2 μ M) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、4mM KCl、10 mM MgCl₂) 中、各濃度の競合物質を加えて室温下 30 分間反応させた。RNA/LpRev 複合体を用いた ATP 結合試験の方法に従った。

引用文献

- (1) Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.
- (2) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- (3) Smith, G. P. *Science*, **1985**, *228*, 1315.
- (4) Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhandiram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.
- (5) Schumacher, T. N. M.; Mayr, L. M.; Minor, D. L.; Milhollen, M. A.; Burgess, M. W.; Kim, P. S. *Science* **1996**, *271*, 1854.
- (6) Fazakerley, G. V.; Russell, J. C.; Wolfe, M. A. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *76*, 601.
- (7) Sheldrick, W. S.; Rieke, E. *Acta Crystallogr.* **1978**, *B34*, 2324.
- (8) Abdallah, M. A.; Biellman, J. F.; Nordstrom, B.; Branden, C. I. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *50*, 475.
- (9) Ye, X.; Gorin, A.; Frederick, R.; Weidong, H.; Majumdar, A.; Xu, W.; Mc-Lendon, G.; Ellington, A. D.; Patel, D. J. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 657.
- (10) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9382.
- (11) Kimotoa, M.; Sakamotoa, K.; Shirouzub, M.; Hiraoc, I.; Yokoyama, S. *FEBS Lett.* **1998**, *441*, 322.
- (12) Gilbert, B. A.; Sha, M.; Wathen, S. T.; Rando, R. R. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1115.
- (13) Schurer, H.; Stembera, K.; Knoll, D.; Mayer, G.; Blind, M.; Forster, H.; Famulok, M.; Wölzel, P.; Hahna, U. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2557.
- (14) Wilson, C.; Nix, J.; Szostak, J. W.; *Biochemistry* **1998** *37*, 14410.
- (15) Saran, D.; Frank, J.; Burke, D. H. *BMC Evol. Biol.* **2003**, *3*, 26.
- (16) Mannironi, C.; DiNardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
- (17) Schneider, C.; Suhnel, J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 287.
- (18) Roychowdhury-Saha, M.; Lato, S. M.; Shank, E. D.; Burke, D. H.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 2492.
- (19) Koizumi, M.; Breaker, R. R. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8983.

第三章

RNA - ペプチド複合体を用いたテーラーメイドバイオセンサーの構築

3-1 蛍光性リボヌクレオペプチド複合体センサー (蛍光 RNP センサー) の構築

現在までに、タンパク質¹⁻⁸や核酸分子⁹⁻²⁶などの生体高分子リセプターをもとにした蛍光センサーが数多く開発されてきた。しかしながら、従来の蛍光センサー作製の方法論では、(1) 蛍光分子を修飾する最適な部位の予測が困難であること、(2) 蛍光分子を化学修飾することにより、リセプター本来の結合活性や安定性を失う可能性があることが問題点として挙げられる。本章では、RNA とペプチドの複合体 (リボヌクレオペプチド、RNP) リセプターのペプチドサブユニットに蛍光分子を導入し、望みとする基質結合および蛍光特性を有する「テーラーメイド蛍光センサー」を構築するための新しい方法論の開発を目的とした。

3-2 ATP 応答性蛍光 RNP センサーの構築

本章では、蛍光 RNP センサーを構築する方法論を開発するため、既に RNP リセプターを得る方法論が確立されている ATP (アデノシン三リン酸) を標的分子として用いた。ATP 結合性 RNP リセプターは、ライブラリー化した RNA サブユニットと Rev ペプチドとの複合体により形成される RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用することにより作製できる²⁷。本章では、Rev ペプチドの N 末端に蛍光分子を化学修飾した蛍光性 Rev ペプチドを合成し、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させることにより、ATP 応答性蛍光 RNP センサーを構築する方法論を示す (図 3-1)。本方法論は、リセプター自身を蛍光センサーに機能改変する従来のセンサー作製法とは異なり、RNP リセプターの基質との結合に関わる RNA サブユニットを化学修飾することなく蛍光センサーを作製できる。そのため、蛍光分

子を化学修飾することによるリセプター本来の結合活性や安定性が失われるという問題点を克服できる。in vitro セレクションにより選択される ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットは、様々な塩基配列を有する RNA サブユニットライブラリーとして得られることが既に示されている²⁷ (本論文第二章参照)。また、ペプチドサブユニットは、励起・発光波長の異なる様々な蛍光分子を Rev ペプチドに化学修飾することにより、蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットライブラリーとして用いることができる。これら RNA サブユニットライブラリー、蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを組み合わせた蛍光 RNP ライブラリーからスクリーニングを行うことにより、迅速に目的とする蛍光特性を有する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを選択できると考えられる。

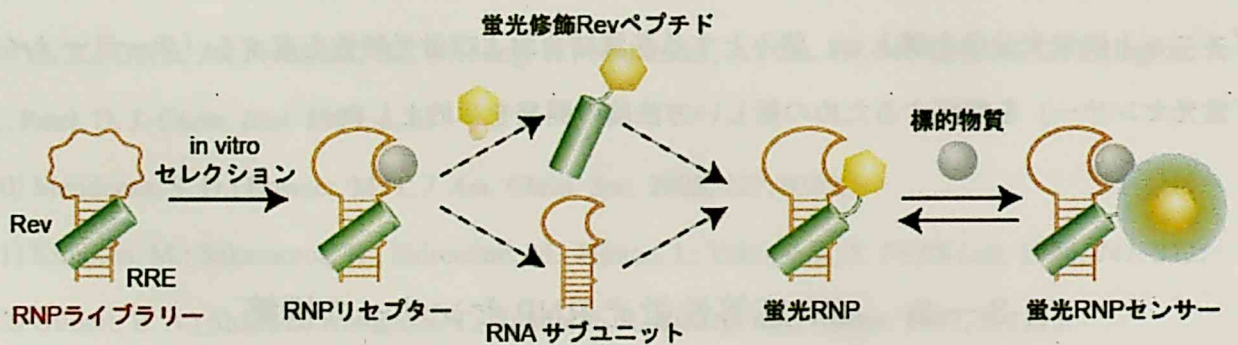


図 3-1 リボヌクレオペプチド (RNP) 複合体を用いた蛍光 RNP センサー構築戦略

3-2-1 in vitro セレクション法を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択

本方法論では、ATP 応答性蛍光 RNP センサーを作製するための第一ステップとして、ATP 結合性 RNP リセプターの作製が必要である。ATP 結合性 RNP リセプターは、第二章で示したランダムな 30 塩基配列を導入した RNA サブユニットと、Rev ペプチドの複合体により形成される RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用することにより作製した。以前の選択には、ATP がアデニン環の C-8 位からリンカーを介してアガロース固定された ATP 固定化アガロース樹脂を使用した。アデニン環の C-8 位を修飾した ATP は塩基部とリボース部が *syn* 配向に平衡が偏り^{28,29}、溶液中の ATP は *anti* 配向をとりやすいことが知られている。この ATP 固定化アガロース樹脂を用いて選択された ATP 結合性 RNP リセプターは、*syn* 配向の ATP に対して選択的に結合することが示されている²⁷。このことから、溶液中の ATP を検出する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを作製するためには、*in vitro* セレクションに用いる ATP 固定化アガロース樹脂の ATP 固定化方法を検討する必要がある。そこで本章では、固定化された ATP がより溶液中の構造に近くなるように、リボースの 2'位と 3'位からリンカー分子を介してアガロース固定されている ATP 固定化アガロース樹脂を用いた。この樹脂に対して RNP を用いた *in vitro* セレクションを行い、ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。10 回選択後、DNA 配列解析より明らかになった RNA サブユニットの塩基配列を示す (図 3-2)。選択された RNA サブユニットの塩基配列は、5'-GUAGUGG-UGUG-3'の保存配列が確認された。この保存配列は、アデニン環の C-8 位から固定化された ATP 固定化アガロース樹脂を用いた時に選択された RNA サブユニットの保存配列 (5'-GUGUA-UA-CU-3') とは異なる配列であった (第二章参照)²⁷。初期 RNP ライブラリーは同様のものを用いて *in vitro* セレクションを行ったにも関わらず、ATP の固定化方法の違いにより異なる保存配列を有する RNP が選択されたのは、固定化された ATP の構造の違いに起因すると考えられる。

	◀ RRE ▶	ランダム領域	▶ RRE ▶		
A01	GGUCUGGGCGCA	CCUUC	GUAGUGG UGUUGUG	UGUG GUUGUUG	UGACGGUACAGGCC
A09	-----	CUGGUGU	GUAGUGG GCUGUG	UGUG AUGCCG	-----
A14	-----	UACUGC	GUAGUGG UUGGUG	UGUG GCGUUU	-----
A15	-----	GCAGU	GUAGUGG UUUGCG	UGUG AUUGCUUA	-----
A17	-----	UUAGAU	GUAGUGG GUAGUG	UGUG UUUUCUG	-----
A21	-----	UUUGC	GUAGUGG UUUUUGUG	UGUG GCUGUA	-----
A23	-----	UUAGAC	GUAGUGG UUUUGUG	UGUG GUCUGC	-----
A24	-----	UGAUUGC	GUAGUGG UUUGUG	UGUG GUUGUC	-----
A25	-----	UGCUG	GUAGUGG GUAUGUG	UGUG CGGCAUU	-----
A26	-----	UUCCG	GUAGUGG UUGUGUG	UGUG CGGUUUU	-----
A30	-----	UAUACC	GUAGUGG UUUGUG	UGUG GGUUGG	-----
A31	-----	CAGAUU	GUAGUGG CUUUUUGUG	UGUG AAUC	-----
A32	-----	UUGUAU	GUAGUGG AUAUGUG	UGUG AUGCCG	-----
A33	-----	GUUUGCUGUUGCCGU	GUAGUGG UUUG	UGUG	-----
A34	-----	U	GUAGUGG UGCC	UGUG AUGGCUGUGUGUGA	-----
A35	-----	UCUUCU	GUAGUGG UUUGCG	UGUG AGUUGUG	-----
A02	-----	UUGCAU	GUUGUGG GUAUGUG	UGUG AUGUAU	-----
A08	-----	UUUUCAUGGCC	CUUGUGG GAAGGAU	UGUG A	-----
A16	-----	UUGGCAC	GAAGUGG UUUG	UGUG UGGUUUU	-----
A36	-----		GUGGUGG UUCG	UGUG GGUGCGCUGGUUUUGU	-----
A29	-----		GUGG UUGGUGGUC	UGUC GGGACGUGCUUGC	-----
A04	-----	AGGGCUUGGUGUGCCGAUUUCGGGGCAUU			-----
A28	-----	AGGGCUUGGUGUGCCGAUUUCGGGGCAUUU			-----
A05	-----	UUUCUCAGGUUUGUACUGUGCGUUGUCCA			-----
A06	-----	GUGUGGGUGGAAAGUAACCGGCUUUUUGUG			-----
A07	-----	GAUGCUUGCCGUUUGUCAUGGUGUGGAGAG			-----
A11	-----	UAGGGAUGUUGUGCGCACUUUGUGUCUCUU			-----
A18	-----	AUUGGUCUUGUCUCGAUUUGGCGCUCGCG			-----
A22	-----	CUGUUUUGGCUUUACCGUUGUGGAACCCGU			-----

図 3-2 ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットの塩基配列

3-2-2 ATP 結合性 RNP リセプターから ATP 応答性蛍光 RNP センサー

への機能改変

in vitro セレクションにより選択された RNP リセプターの ATP 結合能を評価するために、ATP 固定化アガロース樹脂を用いた ATP 結合試験を行った。RNP リセプターは保存配列 5'-GUAGUGG-UGUG-3' を有している A23 RNA (図 3-2) と Rev ペプチドの複合体 A23/Rev を用いた。結合試験の結果より、A23/Rev は ATP に結合することが示され、結合飽和曲線の解析により A23/Rev と ATP の解離定数は $K_D = 21.0 \mu\text{M}$ であることが明らかになった (図 3-3)。続いて、A23/Rev の塩基選択性を評価するため、4 種類の核酸 ATP、GTP (グアノシン三リン酸)、CTP (シチジン三リン酸)、UTP (ウリジン三リン酸) を用いた競合試験を行った。その結果、A23/Rev は、ATP の結合阻害が確認されている濃度領域において他の核酸塩基での結合阻害は認められなかった (図 3-4)。以上の結果より、in vitro セレクションにより選択された RNP リセプターは、核酸塩基を高選択的に識別する ATP 結合性 RNP リセプターであることが明らかになった。

ATP 結合性 RNP リセプターを ATP 応答性蛍光 RNP センサーへ機能改変するため、Rev ペプチドサブユニットの N 末端に蛍光分子を導入した。RRE RNA/Rev ペプチド複合体³⁰ を基本骨格とする RNP リセプターは、Rev ペプチドの N 末端がランダムな塩基配列を導入した位置に近接するよう設計されていることから、ATP の結合に伴い蛍光分子周辺の環境が変化し蛍光発光挙動に影響を与えると期待した。そこでまず、Rev ペプチドの N 末端に蛍光性分子である 1-pyrenesulfonyl chloride を化学修飾した Rev ペプチド (Pyr-Rev) を化学合成により作製した。この Pyr-Rev と A23 RNA から形成される複合体に対して ATP を添加し、それに伴う蛍光発光挙動を観察した (図 3-5)。その結果、A23/Pyr-Rev は ATP の添加に伴い蛍光強度が増加することが確認された。この結果より、ATP 結合性 RNP リセプターから ATP 応答性蛍光 RNP センサーに機能改変できることが明らかになった。続いて、A23/Pyr-Rev に ATP 以外の核酸である GTP、UTP、CTP を添加した時の蛍光強度を測定した。各濃度の核酸存在下 (I) と比存在下 (I_0) の蛍光強度から相対蛍光強度比 (I/I_0) を算出した (図 3-7)。その結果、ATP 存在下では非存在下における初期蛍光強度の 2 倍の蛍光強度を示したにも関わらず、他の核酸塩基を添加した時は変化を示さなかった。この結果は、ATP 結合性 RNP リセプターである A23/Rev が保有し

ていた塩基選択性が、ATP 応答性蛍光 RNP センサーである A23/Pyr-Rev にも維持されていることを示している。また、A23/Pyr-Rev に対する ATP 滴定時に得られる蛍光強度から、ATP 飽和曲線を算出し解析を行った結果、A23/Pyr-Rev と ATP の解離定数は $K_D = 19.5 \mu\text{M}$ であった(図 3-6)。この値はリセプターである A23/Rev とほぼ同じ値であった ($K_D = 9.2 \mu\text{M}$) (図 3-3)。

A23 RNA とは異なる塩基配列の A28 RNA についても同様の試験を行った。ATP 固定化アガロース樹脂を用いた ATP 結合試験結果から、A28/Rev は ATP に結合する RNP リセプターであることが明らかになった(解離定数 $K_D = 15.2 \mu\text{M}$) (図 3-7)。続いて A28/Pyr-Rev に ATP を添加した時の蛍光強度を測定した。その結果、A28/Pyr-Rev も同様に、ATP 添加に伴い蛍光強度が増加した。蛍光強度測定により算出した A28/Pyr-Rev と ATP の解離定数は $K_D = 6.6 \mu\text{M}$ であり、A28/Rev と ATP の解離定数 ($K_D = 15.2 \mu\text{M}$) とほぼ同じ値を示した(図 3-8)。また、A28/Pyr-Rev に ATP 以外の核酸塩基を加えても、蛍光強度変化を示さなかった。

以上の結果より、Rev ペプチドサブユニットに蛍光分子を化学修飾した蛍光性 Rev ペプチドサブユニットを合成し、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させるだけで、本来のリセプターの機能は失わず簡便に ATP 応答性蛍光 RNP センサーに機能変更できることが明らかになった。

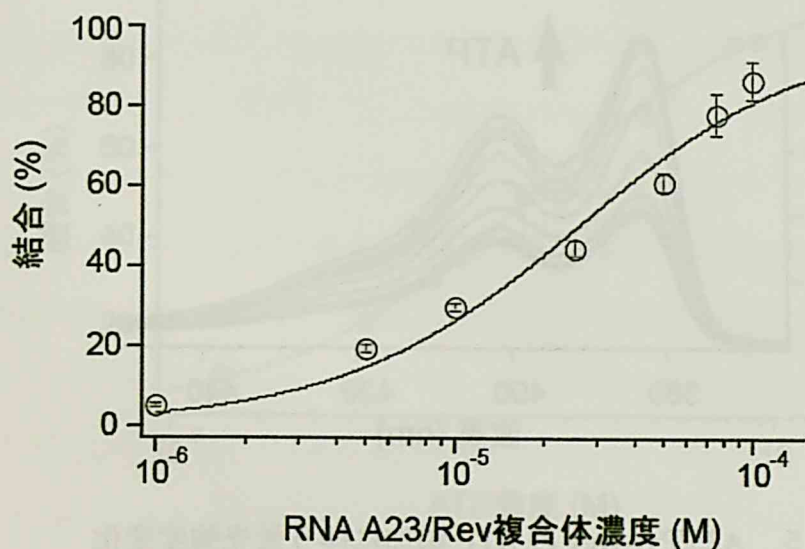


図 3-3 A23/Rev 複合体の ATP 結合評価
A23/Rev 複合体の ATP 結合飽和曲線を示す。結合飽和曲線は、理論式に基づいて近似した曲線を示している。

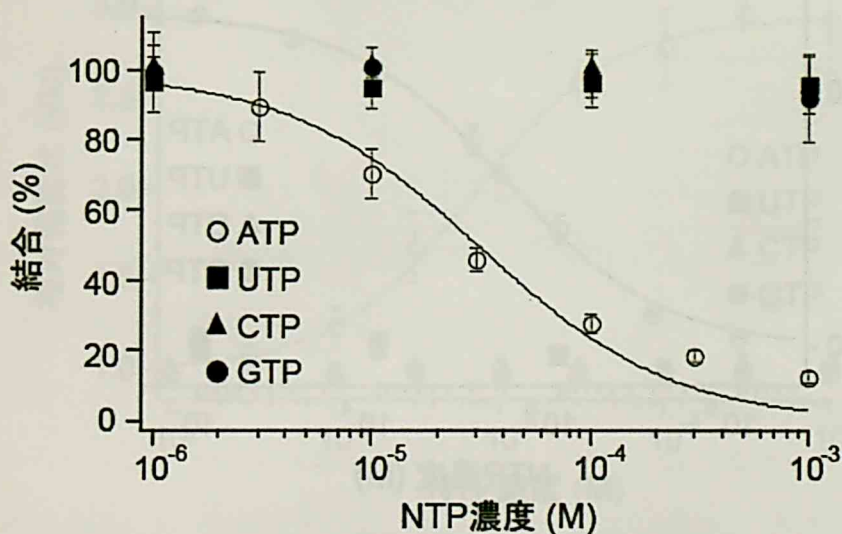


図 3-4 A23/Rev 複合体の塩基選択性評価
ATP (白丸)、UTP (黒四角)、CTP (黒三角)、GTP (黒丸) による競合阻害効果から、RNP33/Rev 複合体の ATP 結合選択性を評価した。

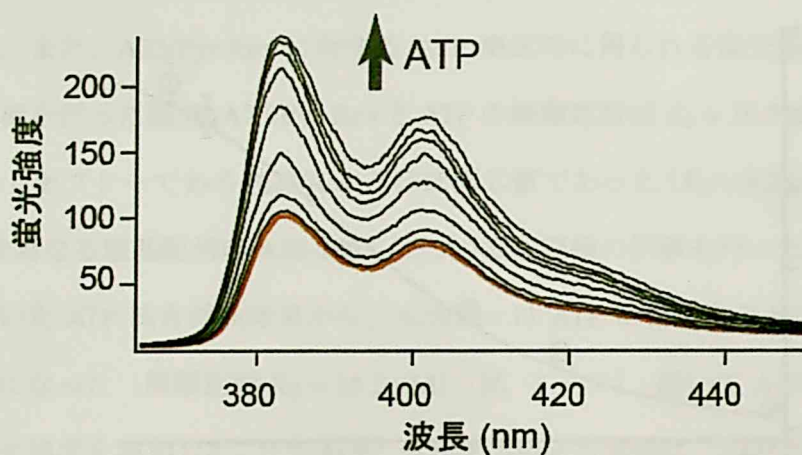


図 3-5 A23/Pyr-Rev の ATP 添加に伴う蛍光強度変化
 A23 RNA/Pyr-Rev 複合体 (0.1 μ M) に対して ATP を 1、3、10、30、100、300、1000、3000 μ M 添加した時の蛍光スペクトルを示す。赤線は ATP 非存在下のスペクトルを示している。

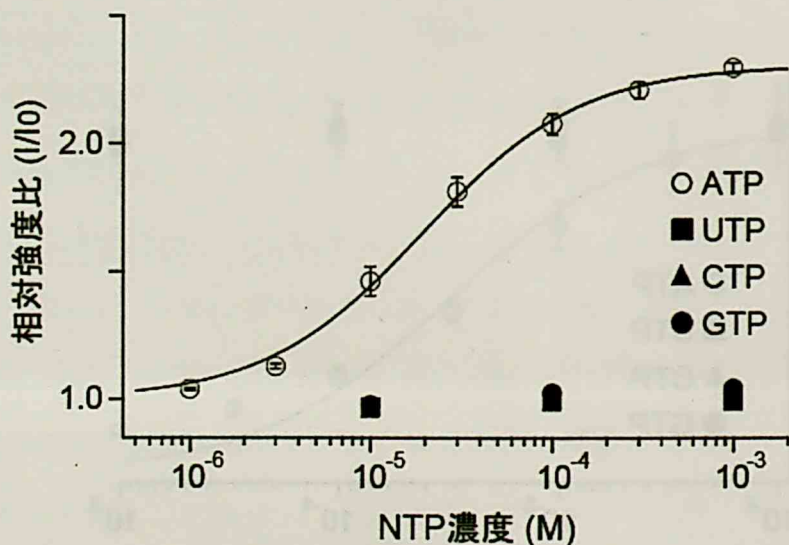


図 3-6 A23/Pyr-Rev の蛍光強度測定による塩基選択性評価
 A23/Pyr-Rev に各濃度の ATP (白丸)、UTP (黒四角)、CTP (黒三角)、GTP (黒丸) を加えた時の相対強度変化比を示す。ATP に関しては理論式により近似した飽和曲線を示している。

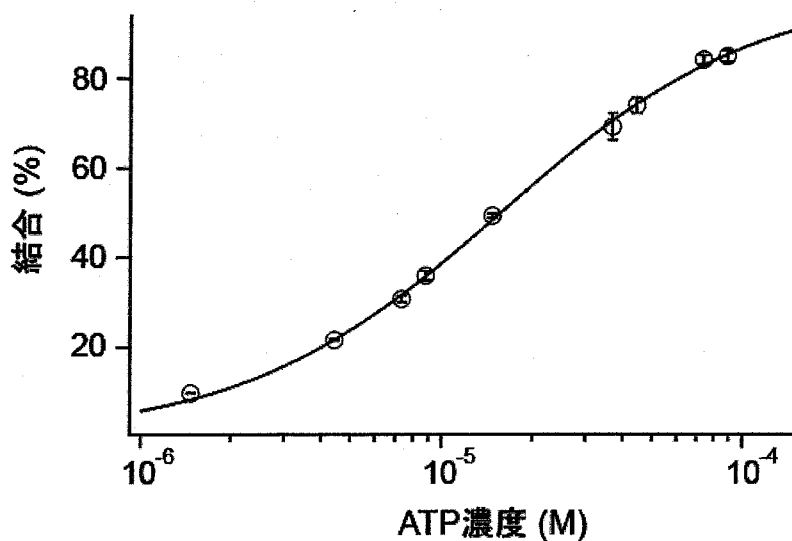


図 3-7 A28/Rev 複合体の ATP 結合評価

A28/Rev 複合体の ATP 結合飽和曲線を示す。飽和曲線は理論式に基づいて近似した曲線を示している。

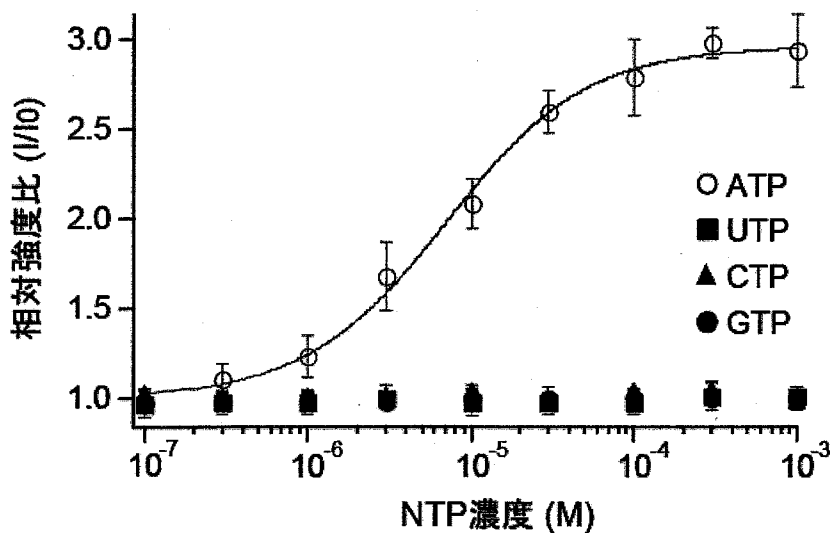


図 3-8 A28/Pyr-Rev の蛍光強度測定による塩基選択性評価

A28/Pyr-Rev に各濃度の ATP (白丸)、UTP (黒四角)、CTP (黒三角)、GTP (黒丸) を加えた時の相対強度変化比を示す。ATP に関しては理論式により近似した飽和曲線を示している。

3-3 蛍光性 RNP ライブラリーを用いた ATP 応答性蛍光 RNP センサーのスクリーニング

in vitro セレクションにより選択された ATP 結合性 RNP リセプターの各 RNA 配列は、ランダム領域内の様々な位置に保存配列が存在し、保存配列以外の配列も豊富な種類が存在している。これらを RNA サブユニットライブラリーとし、蛍光修飾 Rev ペプチドと複合体を形成させることにより、ATP に対して多様な結合特性および発光特性を有する蛍光性 RNP ライブラリーが構築できる。また、様々な蛍光特性を有する蛍光分子を化学修飾した蛍光性 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを用いることにより、励起波長、発光波長の異なる蛍光性 RNP ライブラリーの作製も可能である。したがって、RNA サブユニットライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを組み合わせることで構築した蛍光性 RNP ライブラリーからは、目的とする蛍光特性を有する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることができる (図 3-9)。

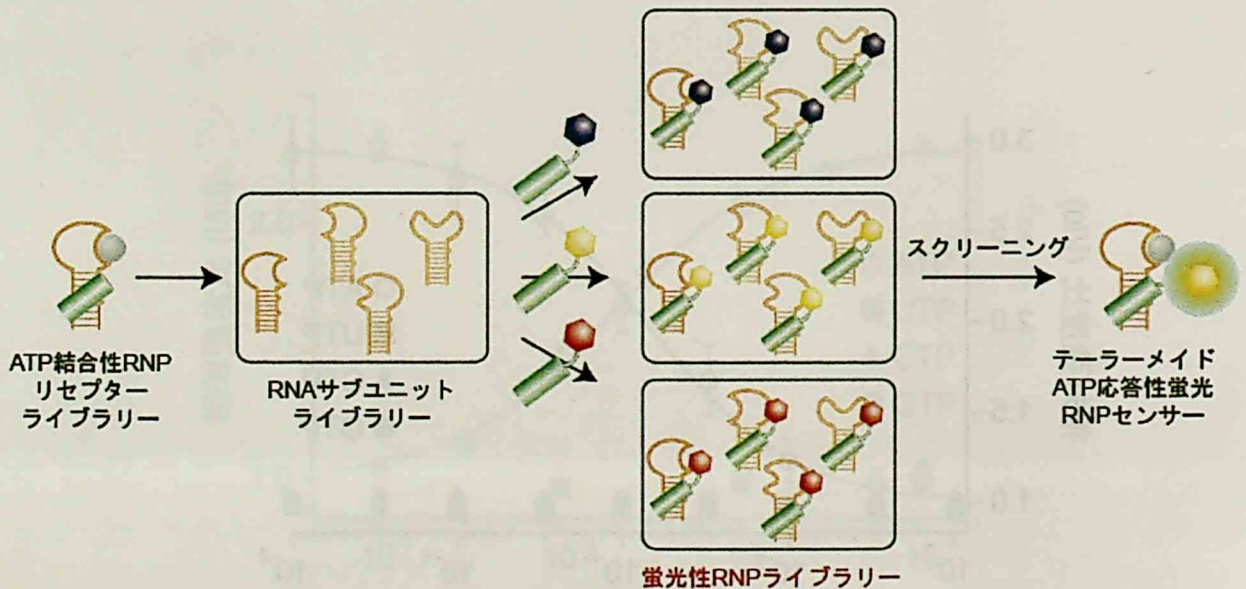


図 3-9 蛍光性 RNP ライブラリーを用いた、目的とする蛍光特性を有する ATP 応答性蛍光 RNP センサーのスクリーニング

3-3-1 ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーの作製

本章で行った *in vitro* セレクションでは、29 種類の ATP 結合性 RNP リセプターが選択された。これらの RNA サブユニット (図 3-2) と蛍光修飾 Rev ペプチドの複合体は、ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーとして用いることができる。そこで、各 RNA サブユニットと、蛍光分子 7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid を Rev ペプチド N 末端に化学修飾した 7mC-Rev を用いて、ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーを構築した。次に、このライブラリーのセンサー評価を行うため、各 RNA/7mC-Rev 複合体をそれぞれマイクロタイタープレートのウェルに加え、蛍光マイクロプレートリーダーにより 1mM ATP 存在下、非存在下での蛍光強度を測定した (図 3-9)。その結果、7mC-Rev のみのレーン (図 3-9 (レーン no RNA)) と比較すると、ほとんどの複合体において、RNA と複合体を形成することにより 7mC-Rev の蛍光が消光を受けていることが観測された (図 3-9)。また、RNA A14、A23、A32、A34、A35、A02、A28、A07、A06 (図 3-9 (レーン 14、23、32、34、35、02、28、07、06)) と 7mC-Rev の複合体は、ATP の添加に伴う蛍光強度の増加が観測された。この簡便なスクリーニングを行うことにより、ATP 添加に伴う蛍光強度変化を示した蛍光性 RNP は、ATP センサーの候補として選択することができる。

次に、望みとする励起・発光波長で応答する蛍光 RNP センサーを得るため、様々な蛍光特性を有する蛍光分子を Rev ペプチドの N 末端に化学修飾し、蛍光性 Rev ペプチドサブユニットライブラリーを作製した。使用した蛍光分子と、作製した蛍光修飾 Rev ペプチドを以下に示す (図 3-10)。蛍光分子 (蛍光修飾 Rev ペプチド) : 7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid (7mC-Rev)、4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole (NBD-Rev)、1-pyrenesulfonyl chloride (Pyr-Rev)、Dansyl chloride (Dan-Rev)、Dapoxy sulfonyl chloride (Dapoxy-Rev)、6-carboxyfluorescein-succinimidyl ester (6FAM-Rev)、Cy5 mono NHS ester (Cy5-Rev)。RNA サブユニットライブラリーと、それぞれ 7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev、Dan-Rev、Dapoxy-Rev、6FAM-Rev、Cy5-Rev の複合体を ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーとして用いた。上に示した方法と同様に、各複合体の ATP 存在下、非存在下での蛍光強度を蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した。蛍光検出波長は 7mC-Rev : 390 nm、Pyr-Rev : 390 nm、Dan-Rev : 535 nm、Dapoxy-Rev : 535 nm、NBD-Rev : 535 nm、6FAM-Rev : 535 nm、Cy5-Rev : 670 nm を用いた。得られた結果をもとに、相対蛍光強度比

(I/I_0) を ATP 存在下 (I) と非存在下 (I_0) の蛍光強度から算出した。各蛍光修飾 Rev ペプチドを使用した時の相対強度比をグラフで示した (図 3-11)。全ての RNA サブユニットと各蛍光性 Rev ペプチド複合体の評価を行った結果、相対強度比の値が 0.6 から 6 までの様々な応答を示した。7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev、Cy5-Rev においては相対強度比が 2 を超える値を示す ATP 応答性蛍光 RNP センサーが存在した (図 3-11(A)、(B)、(E)、(G))。このスクリーニングにより、例えば Cy5-Rev との複合体により形成された蛍光性 RNP ライブラリーからは、発光波長が高波長 (670 nm) であり、相対強度比が 2 を超える ATP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることができる (図 3-11(G))。以上より、蛍光マイクロプレートリーダーを用いた簡便なスクリーニングにより、340 nm から 650 nm の励起波長、390 nm から 670 nm の発光波長で ATP を検出可能な ATP 応答性蛍光 RNP センサーが迅速に得られることを明らかにした。蛍光性 RNP ライブラリーの相対強度比は、各 RNA サブユニットでそれぞれ固有の値を示した。A26 と A30 RNA は 7mC-Rev (図 3-11(A)) もしくは NBD-Rev (図 3-11(E)) と複合体を形成した時、相対強度比が大きな ATP センサーであることが明らかになった。また、同一の RNA サブユニットを用いても、化学修飾する蛍光分子の種類によっては相対強度比が異なる値を示す RNA サブユニットが存在した。A25/Pyr-Rev (図 3-11(B)) では相対強度比 4.5 であったのに対し、A25/7mC-Rev (図 3-11(A)) では 2.5 であった。

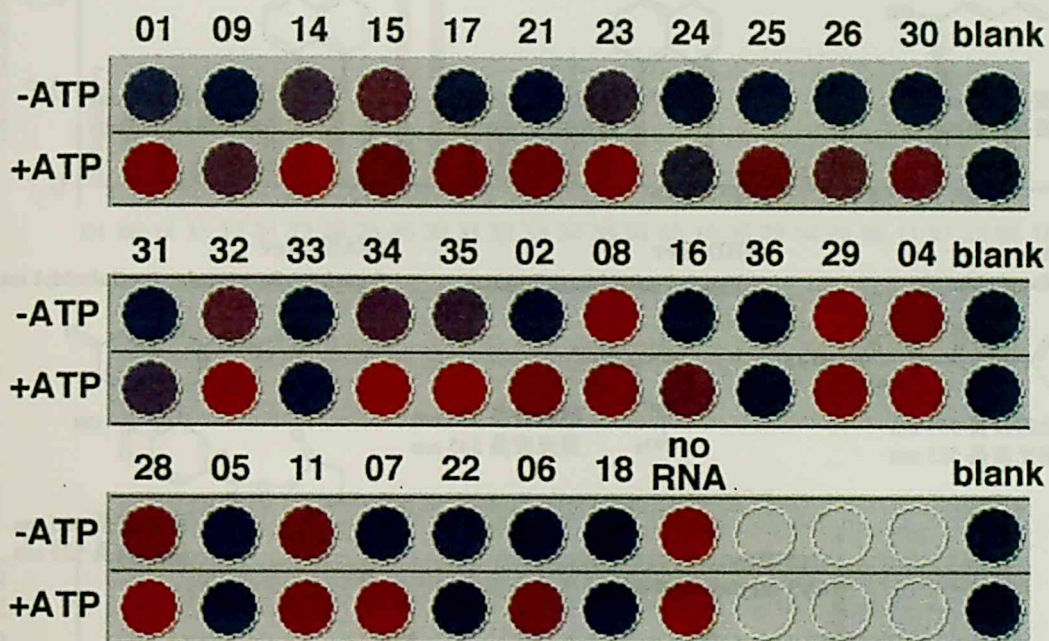
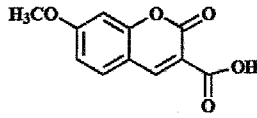


図 3-9 蛍光マイクロプレートリーダーを用いた ATP 存在下、非存在下における RNA/7mC-Rev の蛍光強度イメージ図

それぞれのウェルに各 RNA/7mC-Rev 複合体 (1 μ M) を加え 1 mM ATP 存在下、非存在下における蛍光強度を励起波長 355 nm、発光波長 390 nm を用いてマイクロプレートリーダーにより測定した。各レーンの上に記載した数字は RNA のクローン番号に対応している。イメージ図は蛍光強度が強い場合は赤色、弱い場合は青色で示している。

7mC-Rev
7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid



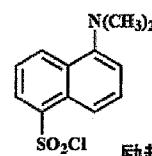
励起波長 355 nm
発光波長 390 nm

Pyr-Rev
1-pyrenesulfonyl chloride



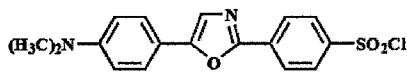
励起波長 355 nm
発光波長 390 nm

Dan-Rev
Dansyl Chloride



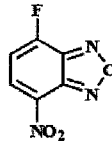
励起波長 340 nm
発光波長 535 nm

Dapoxy-Rev
Dapoxyl sulfonyl chloride



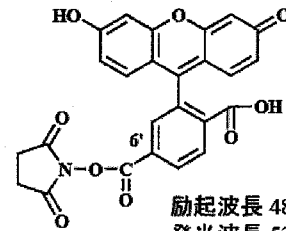
励起波長 355 nm
発光波長 535 nm

NBD-Rev
4-fluoro-7-nitrobenzofurazan



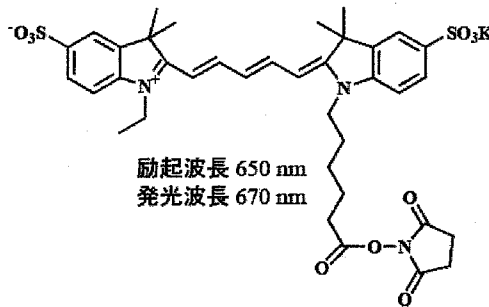
励起波長 475 nm
発光波長 535 nm

6FAM-Rev
6-carboxyfluorescein, succinimidyl ester



励起波長 485 nm
発光波長 535 nm

Cy5-Rev
Cy5 succinimidyl ester



励起波長 650 nm
発光波長 670 nm

図 3-10 蛍光分子の構造とそれぞれの励起、発光波長

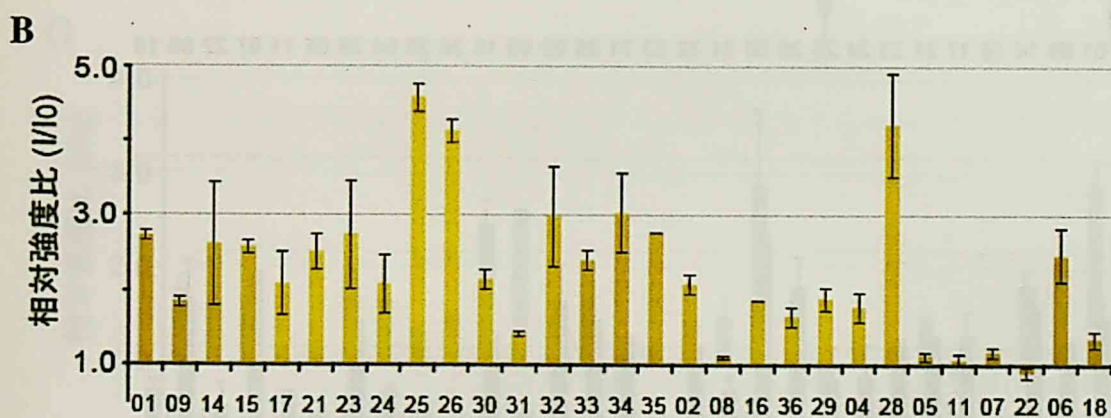
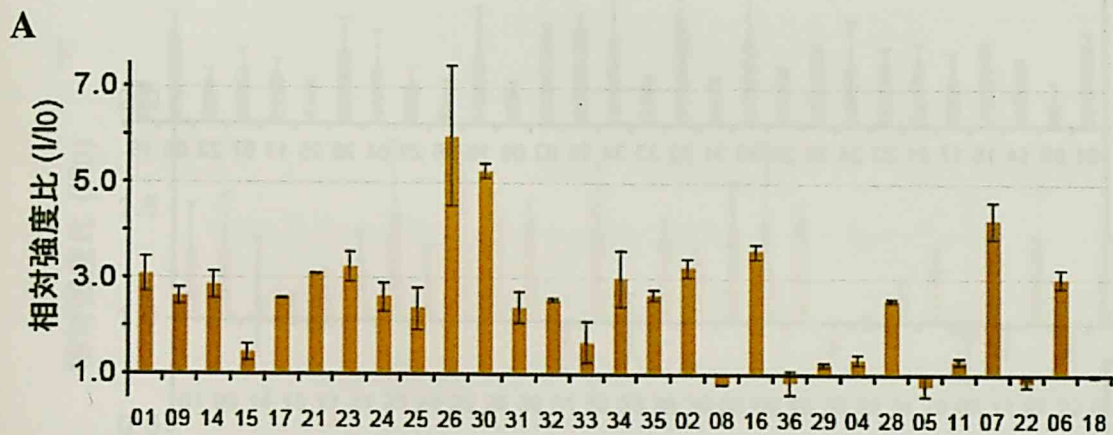


図 3-11 ATP 存在下、非存在下における RNA/蛍光性 Rev ペプチド複合体の相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(A) 7mC-Rev、(B) Pyr-Rev 複合体に対して、ATP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

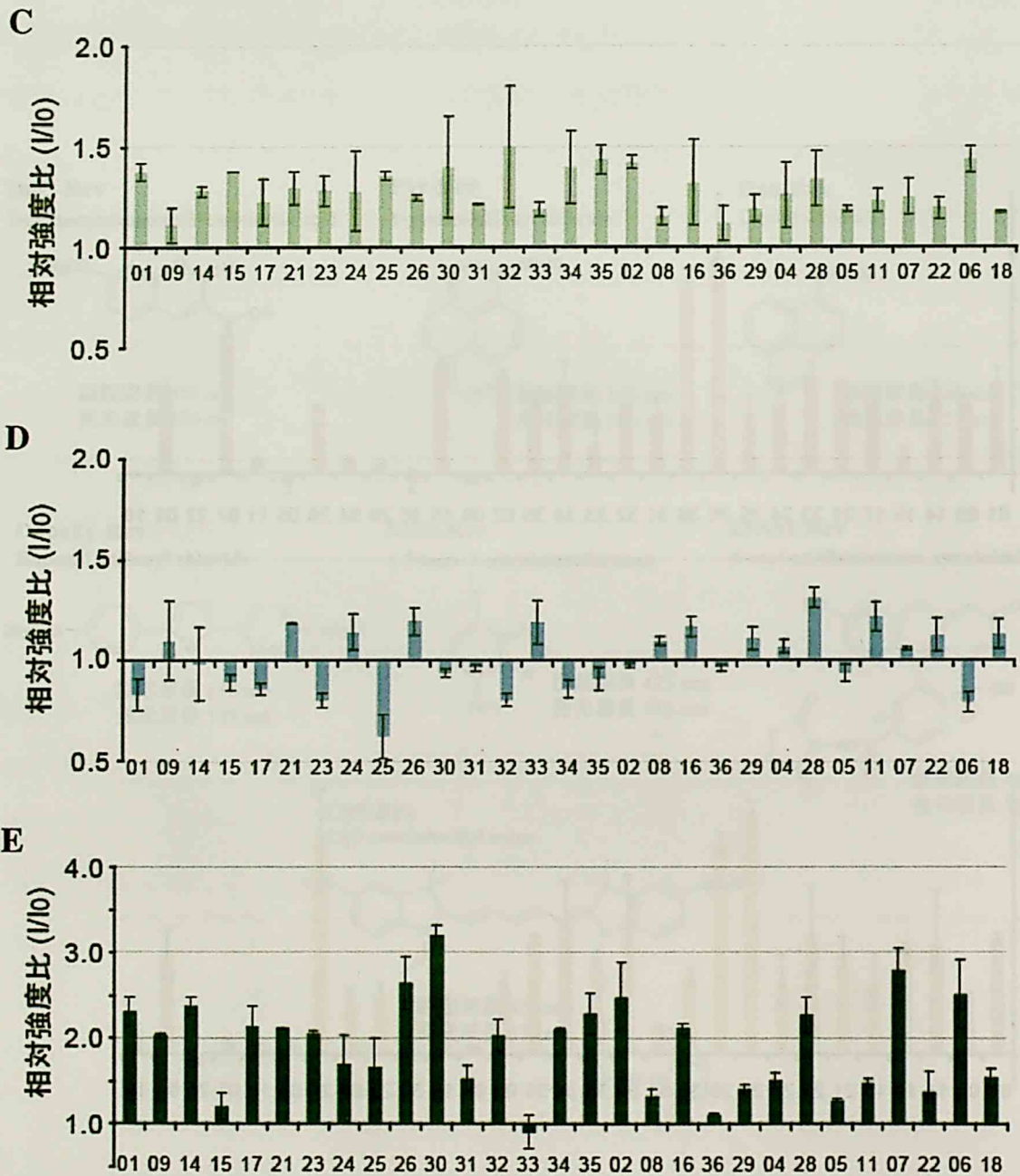


図 3-11 ATP 存在下、非存在下における RNA/蛍光性 Rev ペプチド複合体の相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(C) Dan-Rev、(D) Dapoxy-Rev、(E) NBD-Rev 複合体に対して、ATP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

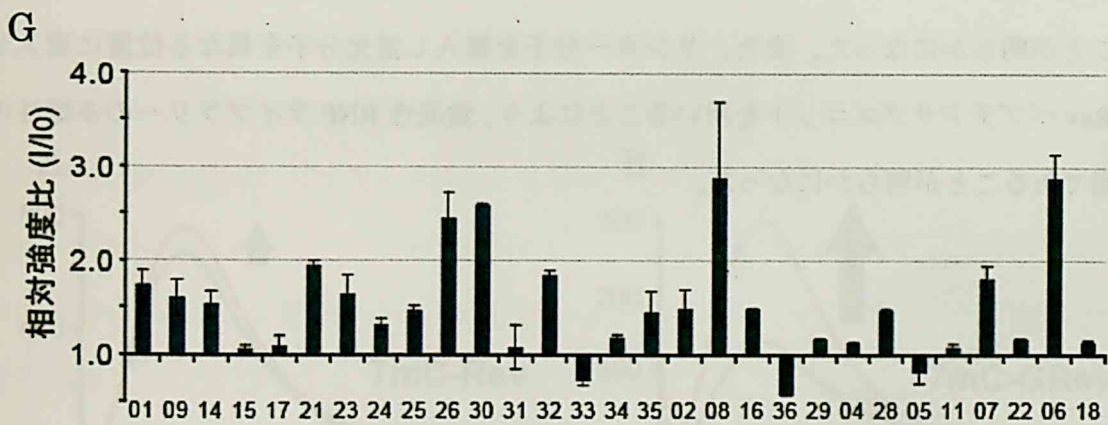
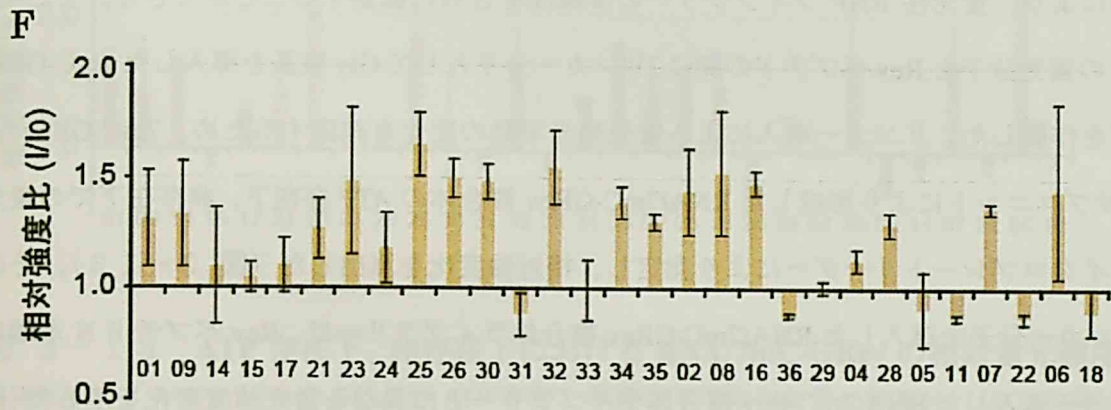


図 3-11 ATP 存在下、非存在下における RNA/蛍光性 Rev ペプチド複合体の相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(F) 6FAM-Rev、(G) Cy5-Rev 複合体に対して、ATP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

3-3-2 リンカー分子導入による蛍光性 RNP ライブラリーの拡張

蛍光分子は微小な環境変化に対して鋭敏に影響を受けることから、Rev ペプチドと蛍光分子の間にリンカー分子を導入することで、蛍光性 RNP の蛍光発光挙動が変化すると考えられる。この修飾により、蛍光性 RNP ライブラリーの多様性をさらに拡張することができる。そこで、7mC-Rev の蛍光分子と Rev ペプチドの間に、リンカー分子として Gly 残基を導入した 7mC-GRev ペプチドを作製した。リンカー導入による蛍光発光挙動の変化を確認するため、7mC-GRev と各 RNA サブユニットにより形成した RNA/7mC-GRev 複合体の ATP 存在下、非存在下での蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定し、相対強度比を算出した (図 3-13)。その結果、リンカー分子を導入した RNA/7mC-GRev 複合体ライブラリーは、Rev ペプチド N 末端に直接蛍光分子導入した RNA/7mC-Rev 複合体ライブラリーとは異なる蛍光強度変化を示した (図 3-11(A)、3-13)。相対強度比の値は、ほとんどの RNP センサーにおいて減少したが、A08/7mC-GRev は A08/7mC-Rev と比較して相対強度比の値が増加した (図 3-14)。この結果より、同一の蛍光分子を用いた場合でも、リンカー分子を導入することにより相対強度比が変化することが明らかになった。また、リンカー分子を導入し蛍光分子を異なる位置に導入した蛍光性 Rev ペプチドサブユニットを用いることにより、蛍光性 RNP ライブラリーの多様性の拡張が可能であることが明らかになった。

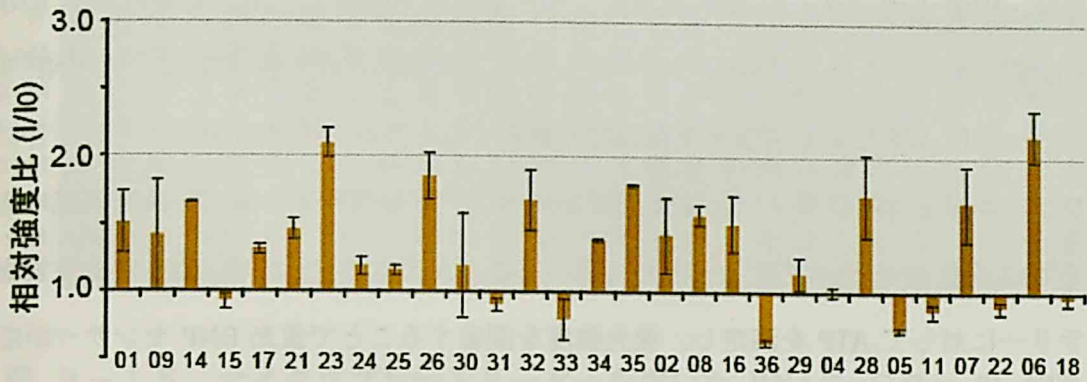


図 3-13 ATP 存在下、非存在下における RNA/7mC-GRev の相対蛍光強度比
各 RNA サブユニット/7mC-GRev の ATP 存在、非存在下での相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示している。

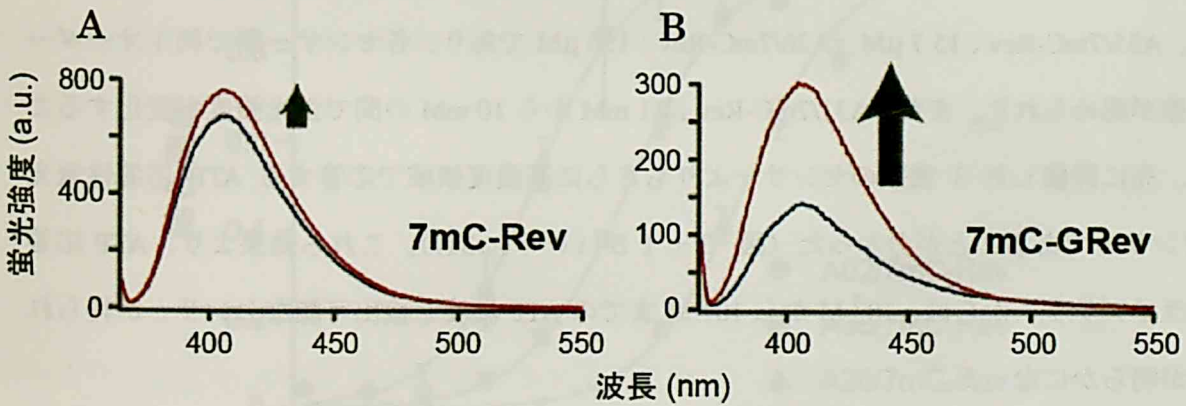


図 3-14 A08 RNA/7mC-Rev と A08 RNA/7mC-GRev の蛍光スペクトル測定
(A) A08 RNA/7mC-Rev と (B) A08 RNA/7mC-GRev を用いた ATP 存在下 (赤)、非存在下 (青) で測定した蛍光スペクトル曲線を示す。

3-3-3 幅広い ATP 濃度領域で応答する蛍光 RNP センサーのスクリーニング

本方法論では、RNP リセプターの ATP 親和性、ATP 選択性を維持し、ATP 応答性蛍光 RNP センサー機能改変できる。また、*in vitro* セレクションにより選択された各 ATP 結合性 RNP リセプターは、それぞれ ATP に対して様々な親和性で結合する。これらの性質を利用することにより、RNA サブユニットライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドの複合体を幅広い濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーとして用いることができる。そこで、ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーに対して ATP を滴定し、蛍光強度を測定することで蛍光 RNP センサーが応答する濃度領域を確認した。各 RNA/7mC-Rev に対して ATP を 10 nM から 10 mM まで滴定し、それぞれの蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した。蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した結果の蛍光強度イメージ図を示す (図 3-15)。その結果、蛍光強度が変化し始める ATP 濃度領域はそれぞれの複合体で異なることが観測された。そこで、蛍光強度が飽和する中間点の ATP 濃度が大きく異なっている 3 種類のセンサー A02/7mC-Rev、A35/7mC-Rev、A26/7mC-Rev について詳しく評価を行った。上に示した 3 種類の ATP センサーに対して ATP を滴定し、各濃度における蛍光強度を測定することにより ATP 結合飽和曲線を算出した (図 3-16)。その結果、蛍光強度変化が飽和する ATP 濃度の中間点は、A02/7mC-Rev : 2.2 μ M、A35/7mC-Rev : 15.7 μ M、A26/7mC-Rev : 156 μ M であり、各センサー間で約 1 オーダーの値の差が認められた。また、A31/7mC-Rev は 1 mM から 10 mM の間で蛍光強度が変化することから、先に評価した 3 種類のセンサーよりもさらに高濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーであることが分かった (図 3-15 (レーン 31))。これら結果より、ATP 応答性蛍光ライブラリーからは、 10^{-7} M から 10^{-2} M までの ATP 濃度を検出可能なセンサーが得られることが明らかになった。

RNA/7mC-Rev

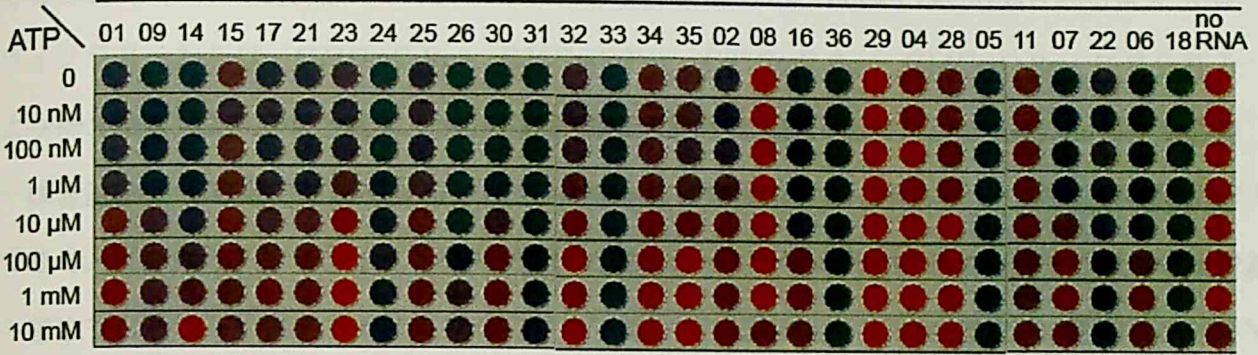


図 3-15 マイクロプレートリーダーを用いた RNA/7mC-Rev の ATP 滴定時の蛍光強度イメージ図

各 RNA/7mC-Rev をそれぞれのウェルに加え、図左に示した濃度に対応した ATP を添加した時の蛍光強度を、マイクロプレートリーダーにより測定した結果のイメージ図を示す。上に示した数字は RNA サブユニットのクローン番号に対応している。イメージ図は蛍光強度が強い場合は赤色、弱い場合は青色で示している。

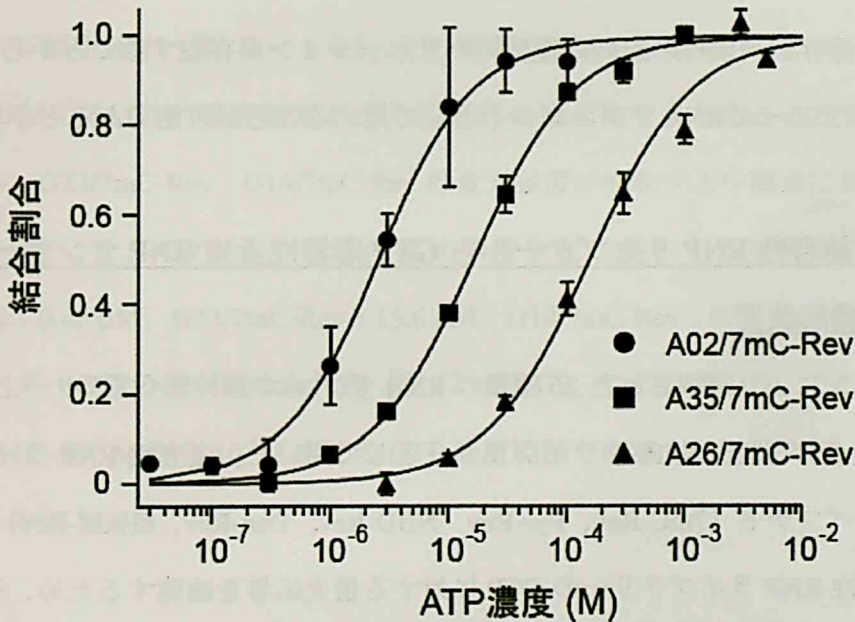


図 3-16 蛍光強度測定により算出した A02、A35、A26/7mC-Rev の ATP 結合飽和曲線

ATP 滴定による蛍光強度変化により算出した A02/7mC-Rev (黒丸)、A35/7mC-Rev (黒四角)、A26/7mC-Rev (黒三角) の結合飽和曲線を示す。それぞれ理論式により近似した曲線を示している。

3-4 GTP 応答性蛍光 RNP センサーの構築

現在までに *in vitro* セレクション法により様々な標的分子に対して結合する RNA アプタマー³¹⁻³³ が作製されていることから、本方法論における RNP 用いた *in vitro* セレクションでも任意の基質分子に対して結合する RNP リセプターの作製が可能である。つまり、得られた RNP リセプターから簡便に蛍光性センサーに機能改変できる本方法論は、任意の標的分子に対して応答する蛍光性 RNP センサーが容易に作製できると考えられる。そこで、ここまでに示した方法論が ATP 以外の標的分子に対しても適応可能であることを示すため、標的分子を GTP として GTP 応答性蛍光 RNP センサーの構築を行った。

3-4-1 *in vitro* セレクション法を用いた GTP 結合性 RNP リセプターの選択

まず、RNP ライブラリーを用いた *in vitro* セレクションを行い、GTP 結合性 RNP リセプターを選択した。得られた RNA サブユニットの塩基配列は、5'-GCGG-UGUCUAC-3' が保存配列として確認された(図 3-17)。これらの GTP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットも、保存配列の位置や、保存配列以外の配列に複数のバリエーションが存在することから、GTP 応答性蛍光 RNP ライブラリーの RNA サブユニットとして用いることが可能であると示唆される。

3-4-2 GTP 結合性 RNP リセプターから GTP 応答性蛍光 RNP センサーへの機能改変

in vitro セレクションにより選択された 26 種類の RNA サブユニットライブラリーと、蛍光修飾 Rev ペプチドの複合体を蛍光性 RNP ライブラリーとして用いた。蛍光性 RNP ライブラリーは、各種蛍光性 Rev ペプチド (7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev、Dan-Rev、6FAM-Rev) を用いて作製した。この蛍光性 RNP ライブラリーの GTP に対する蛍光応答を確認するため、各 RNA と蛍光修飾 Rev ペプチドの複合体の GTP 存在下、非存在下における蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定し、相対強度比を算出した(図 3-18)。その結果、ATP 応答性蛍光 RNP センサーの場合と同様に、GTP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと 7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev により形成される蛍光性 RNP ライブラリーからは、相対強度比の値が 2 を超える GTP

応答性蛍光 RNP センサーが得られることが明らかになった。7mC-Rev で形成される蛍光 RNP ライブラリーからは、G23/7mC-Rev、G26/7mC-Rev、G05/7mC-Rev、G14/7mC-Rev に見られるように、相対強度比が 4 を超える非常に大きな値を示した (図 3-18(A))。これらのセンサーは、GTP を高感度に検出できる GTP 応答性蛍光 RNP センサーの候補として選択することができる。ATP センサーの場合にも観測されたように、GTP センサーの場合も同一の RNA サブユニットを用いても蛍光分子に依存的な相対強度比の変化が観測された。G05/7mC-Rev の相対強度比は約 6 であるのに対し (図 3-18 (A))、G05/Pyr-Rev (図 3-18 (B)) は約 1 であった。

3-4-3 幅広い GTP 濃度レンジで応答する蛍光 RNP センサーのスクリーニング

GTP 応答性蛍光 RNP ライブラリーに対して GTP を滴定し、各濃度の GTP 存在時における蛍光強度を測定することにより GTP 応答性蛍光 RNP センサーが応答する濃度領域を確認した。各 RNA/7mC-Rev に対して GTP を 100 nM から 1 mM まで滴定し、それぞれの蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した。蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した結果の蛍光強度イメージ図を示す (図 3-19)。その結果、ATP 応答性 RNP センサーと同様に、蛍光強度が変化し始める GTP 濃度領域が、それぞれの複合体で異なることが明らかになった。G10/7mC-Rev、G23/7mC-Rev、G14/7mC-Rev は蛍光強度が飽和する中間点における GTP 濃度が大きく異なっていた。これら 3 種類の蛍光強度変化が飽和する中間点の GTP 濃度は、G10/7mC-Rev : 0.45 μ M、G23/7mC-Rev : 15.6 μ M、G14/7mC-Rev : 97.3 μ M であり、各センサー間で約 1 オーダーの値の差が認められた (図 3-20)。この結果より、この蛍光性 RNP ライブラリーからは $\sim 10^{-7}$ M から 10^{-3} M までの GTP 濃度範囲で応答する蛍光 RNP センサーが得られることが明らかになった。

	← RRE →		ランダム領域		← RRE →
G03	GGUCUGGGCGCA	UAAU	GCGG CGUUGUUUAUCG	UGUCUAC AUG	UGACGGUACAGGCC
G08	-----	UCGUU	GCGG UGUUUUACA	UGUCUAC AUGG	-----
G09	-----	UUGGC	GCGC UGUGACUUA	GGUCUAC GUGA	-----
G20	-----	GUGUC	GCGA AGUGUUGGCU	UGUCUAC GUGC	-----
G23	-----	UGGA	GCGG CUUGUUGCGGAG	UGUCUAC UUG	-----
G26	-----	UUAAU	GCGG CCCUGAAGGG	CGUCUAC AUGU	-----
G28	-----	UUGUU	GCGG CGUUAUGGCG	UGUCUAC AUAG	-----
G31	-----	GUCGUU	GCGG AUCUUGGUGAU	UGUCUAC A	-----
G33	-----	UUGUU	GCGG CGUUAUGGCG	UGUCUAC AUAG	-----
G35	-----	CGUG	GCGG GGACUCUUGUCU	UGUCUAC CUG	-----
G02	-----		UGUCUAC CUGUGCAUGCUUGCGCGUG	GCGA	-----
G04	-----		UGUCUAC CUGUGCAUGCUUGCGCGUG	GCGG	-----
G27	-----	AGGA	UGUCUA CUCGUUUGGCGG	GCGG UUUU	-----
G10	-----	UUGUAGGUAC	AGCUGUUUCUGCU	GCGG UUU	-----
G16	-----	UUGUAGGUAC	GGAGUGGGUUUCC	GCGG UUU	-----
G07	-----	GUGGUUGGCGGGCU		GCGGUC CGUCUUGCUG	-----
G13	-----	CUGUCUUACGGCGUGGUUG		GCGGUC GCGGG	-----
G17	-----	CAAGGGUUUGGU		GCGGUC GGUGGGCGUUG	-----
G25	-----	UGUUUUGGUUUCGGUAGUCCU		GCGGUC CUUGU	-----
G19	-----	GUGGCCUGGGGUAU		GUGGUC GAGUUGUUGC	-----
G30	-----	GUCGUAGCGCGCUGUUUGUA		GUGGUC AACU	-----
G12	-----	UGCCGUCGUA		AUACCUG AUUUUUUCGUGGC	-----
G29	-----	CGUGGCUGGCCUUGUUGGGUUGU		AUACCUG	-----
G05	-----	UAGUCGGCGGUUCGAUUGAACGUUAUCCCG			-----
G14	-----	CUUUACACGGCUUCGUGCGGUCUUGGGUG			-----
G34	-----	GAUGGCGCGGCCUUGAUGGUGUUUACGUUU			-----

図 3-17 GTP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットの塩基配列

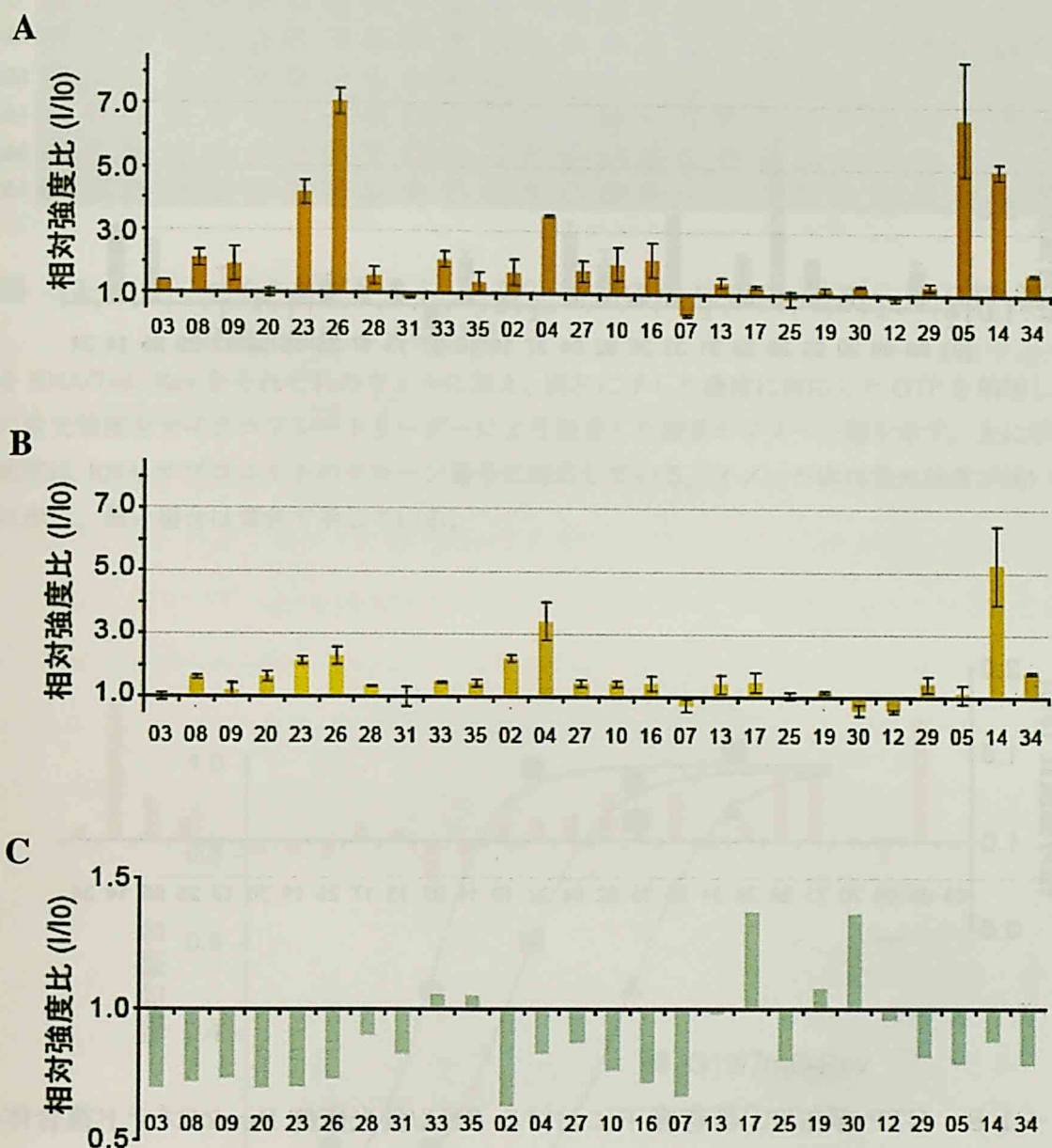
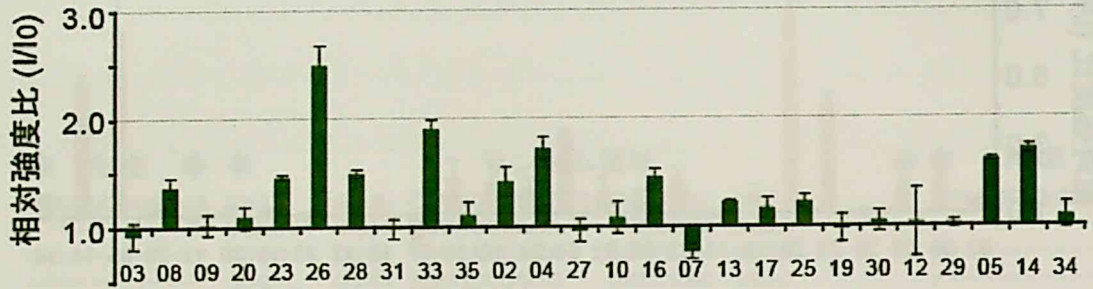


図 3-18 GTP 存在下、非存在下における RNA/蛍光修飾 Rev ペプチド複合体の 相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(A) 7mC-Rev、(B) Pyr-Rev、(C) Dan-Rev の複合体に対して、GTP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

D



E

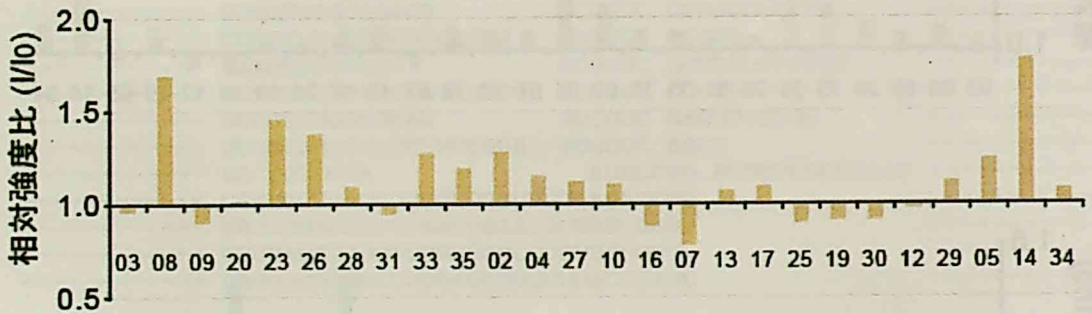


図 3-18 GTP 存在下、非存在下における RNA/蛍光修飾 Rev ペプチド複合体の
相対蛍光強度比

各 RNA サブユニットと異なる蛍光修飾 Rev ペプチド、(D) NBD-Rev、(E) 6FAM-Rev の複合体に対して、GTP 存在 (I)、非存在時 (I_0) の相対蛍光強度比 (I/I_0) を棒グラフで示した。

RNA/7mC-Rev

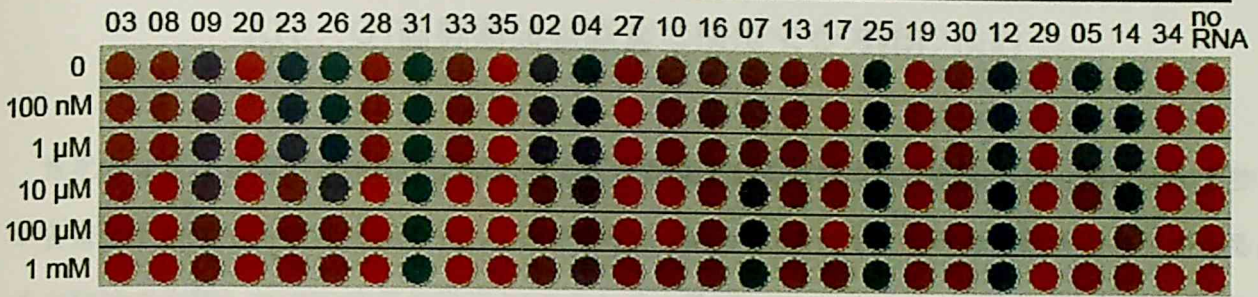


図 3-19 マイクロプレートリーダーを用いた RNA/7mC-Rev の GTP 滴定時の蛍光強度イメージ図

各 RNA/7mC-Rev をそれぞれのウェルに加え、図左に示した濃度に対応した GTP を添加した時の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した結果のイメージ図を示す。上に示した数字は RNA サブユニットのクローン番号に対応している。イメージ図は蛍光強度が強い場合は赤色、弱い場合は青色で示している。

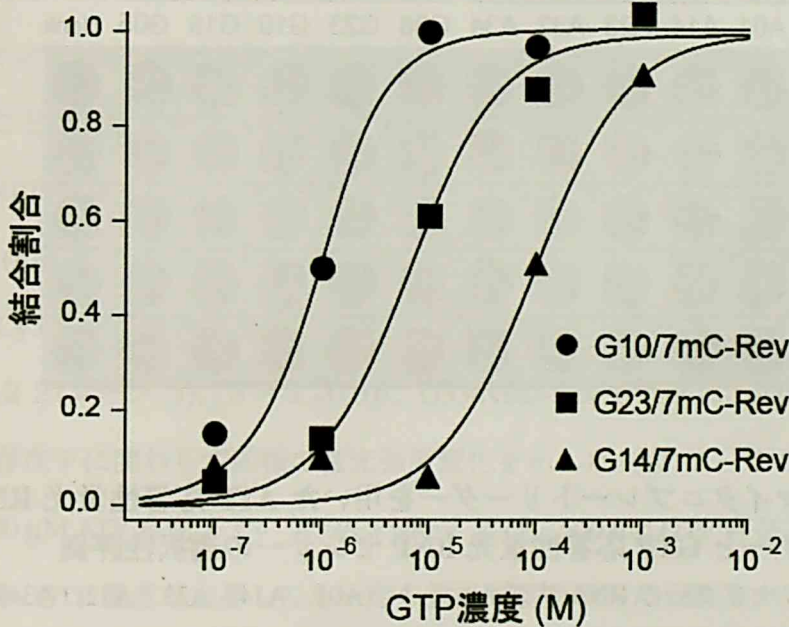


図 3-20 蛍光強度測定により算出した G10、G23、G14/7mC-Rev の GTP 結合飽和曲線

GTP 滴定による蛍光強度変化により算出した G10/7mC-Rev (黒丸)、G23/7mC-Rev (黒四角)、G14/7mC-Rev (黒三角) の結合飽和曲線を示す。それぞれ理論式により近似した曲線を示している。

3-5 蛍光マイクロプレートリーダーを用いた ATP、GTP 応答性蛍光 RNP センサーの塩基選択性評価

ここまで得られた ATP、GTP 応答性蛍光 RNP センサーの塩基選択性をマイクロプレートリーダーにより評価するために、それぞれの RNP センサーに ATP、GTP、CTP、UTP を加え蛍光強度測定を行った。各縦レーンに A01、A14、A23、A32、A34、G08、G23、G10、G16、G05 RNA と 7mC-Rev により構築された蛍光 RNP センサーを加え、それぞれの核酸を終濃度 0.1 mM となるように添加した。蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した結果のイメージ図を示す(図 3-21)。それぞれ A01、A14、A23、A32、A34 のレーンでは、ATP が存在している時のみ蛍光強度変化を示し、同様に G08、G23、G10、G16、G05 のレーンでは、GTP が存在している時のみ蛍光強度変化を示した。これらの結果より、本方法論で作製した蛍光 RNP センサーは、塩基選択的に応答する蛍光性 RNP センサーであることが明らかになった。

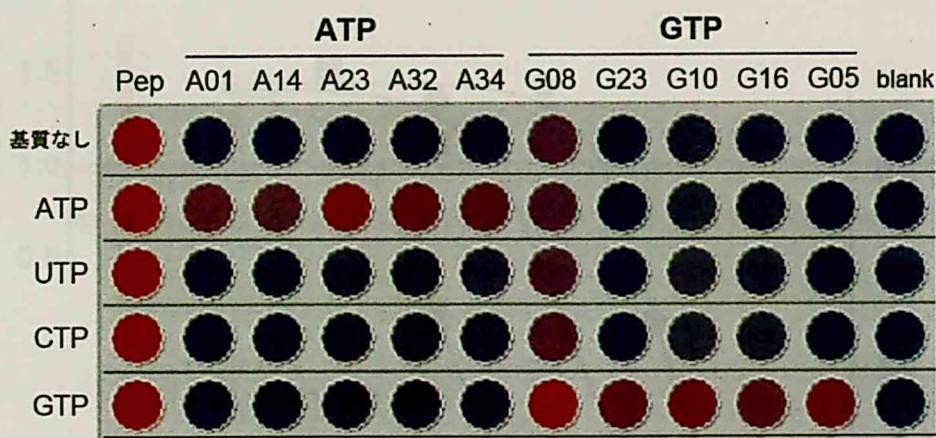


図 3-21 マイクロプレートリーダーを用いた ATP 応答性蛍光 RNP センサーと GTP 応答性蛍光 RNP センサーの選択性評価

ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニット (A01、A14、A23、A32、A34) と GTP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニット (G08、G23、G10、G16、G05) を用いて、それぞれの RNA と 7mC-Rev から構築されるセンサーに対して塩基選択性試験を行った。マイクロプレートのウェルにセンサーを加え、0.1mM ATP、UTP、CTP、GTP 存在時の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにより測定した結果のイメージ図を示す。Pep レーンは 7mC-Rev ペプチドのみを加えた。Blank レーンには用いたバッファーのみを加えた。イメージ図は蛍光強度が強い場合は赤色、弱い場合は青色で示している。

3-6 蛍光マイクロプレートリーダーを用いたATPとGTP共存溶液中のATP、GTPを異なる波長で検出する方法の検討

蛍光センサーを用いて細胞内や細胞抽出液中の標的物質を検出するためには、複数の化合物が含まれた溶液中の標的物質に対して高選択的に応答する蛍光センサーを作製する必要がある。本方法論で作製したATP応答性蛍光RNPセンサー及びGTP応答性蛍光RNPセンサーは、それぞれATP、GTPに対して高選択的に応答する(図3-21)。また、本方法論では望みとする波長で応答するRNPセンサーを自由に作製できることから、ここまで得られたATPセンサーとGTPセンサーを用いて、ATPとGTPが共存した溶液中でそれぞれATPとGTPを異なる波長で検出することが可能であるかを検討した。ここまでスクリーニングを行った結果から、試験に用いるATPセンサーはA32/Cy5-Rev、GTPセンサーはG33/NBD-Revを選択した。A32/Cy5-Rev、G33/NBD-Revを同一マイクロプレートに加え、500 μM ATP及びGTPが存在した状態でのATP、GTP滴定時の蛍光強度を異なる波長で測定した(図3-22)。得られたそれぞれの結果をもとに飽和曲線を近似し、解離定数を算出した(図3-23、図3-24)。その結果、ATPセンサーA32/Cy5-Revはサブ μM からmMオーダーのATP濃度範囲を670 nmの波長で検出することが可能であり($K_D = 4.8 \mu\text{M}$) (図3-22(レーン1)、3-23(A))、GTPセンサーG33/NBD-Revも同様の濃度領域で存在するGTPを535 nmで検出可能であることが明らかになった($K_D = 8.6 \mu\text{M}$) (図3-22(レーン6)、3-24(A))。また、GTPが500 μM 存在下でもA32/Cy5-Revは蛍光強度変化を示し、GTP非存在下と同様の応答を示した($K_D = 7.8 \mu\text{M}$) (図3-22(レーン3)、3-23(B))。G33/NBD-Revも同様に、500 μM ATP存在下($K_D = 9.7 \mu\text{M}$)、非存在下に関わらず同様の蛍光強度変化を示した(図3-22レーン8、図3-24(B))。500 μM ATP存在下でのA32/Cy5-Rev及び、500 μM GTP存在下でのG33/NBD-RevはそれぞれATP、GTP濃度が上昇しても一定の蛍光強度を示した(図3-22(レーン4、7))。これらの結果より、本章で作製したATP応答性蛍光RNPセンサーとGTP応答性蛍光RNPセンサーを用いることにより、ATP、GTP共存溶液中の各ATP、GTPを望みとする波長で検出することが明らかになった。

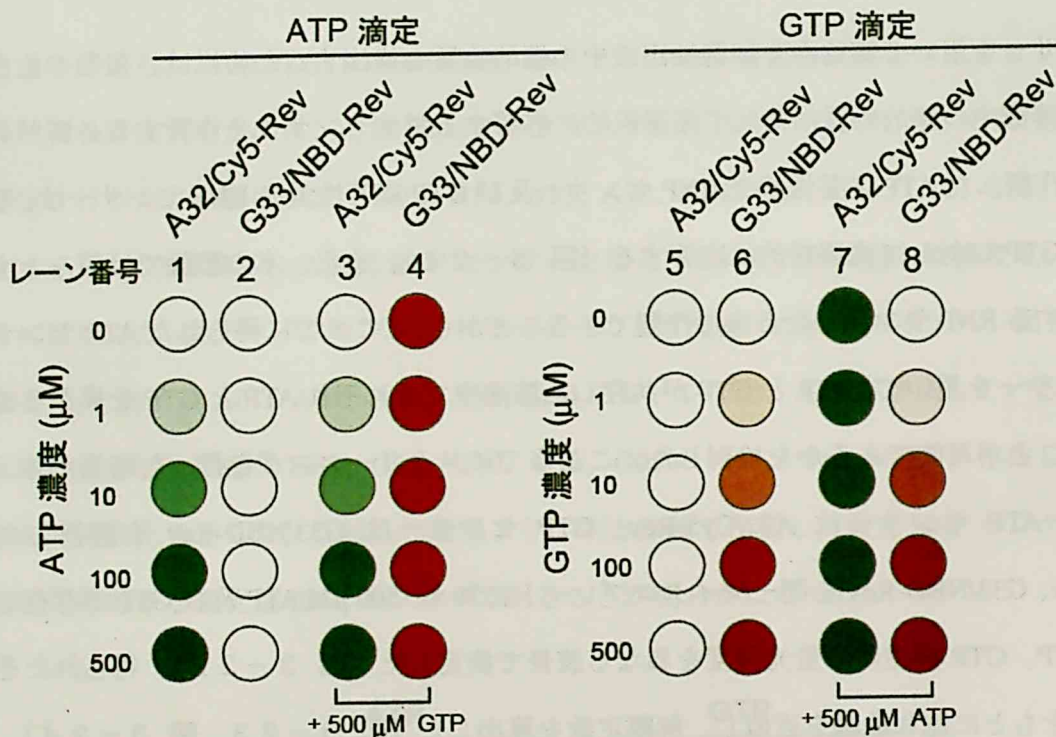


図 3-22 ATP、GTP 共存溶液中での ATP 応答性蛍光 RNP センサーと GTP 応答性蛍光 RNP センサーに対する ATP、GTP 滴定結果のイメージ図

ATP センサー A32/Cy5-Rev (レーン 1、3、5、7) と GTP センサー G33/NBD-Rev (レーン 2、4、6、8) に対して ATP、GTP を 1、10、100、500 μM 滴定時の相対強度比を色の濃淡で可視化したイメージ図を示す。レーン 1 からレーン 4 には ATP 滴定、レーン 5 からレーン 8 は GTP 滴定を行った結果を示している。検出波長は ATP センサー (670 nm)、GTP センサー (535 nm) を用いた。レーン 3、4 は 500 μM GTP を、レーン 7、8 は 500 μM ATP が共存した状態での相対強度比を示している。イメージ図に用いた色は各 ATP、GTP 非存在下 (相対強度比 1) の値を淡色で、相対強度比の変化が飽和する値を濃色で示している。相対強度変化が飽和する値は図 2-22 の飽和曲線より算出した。

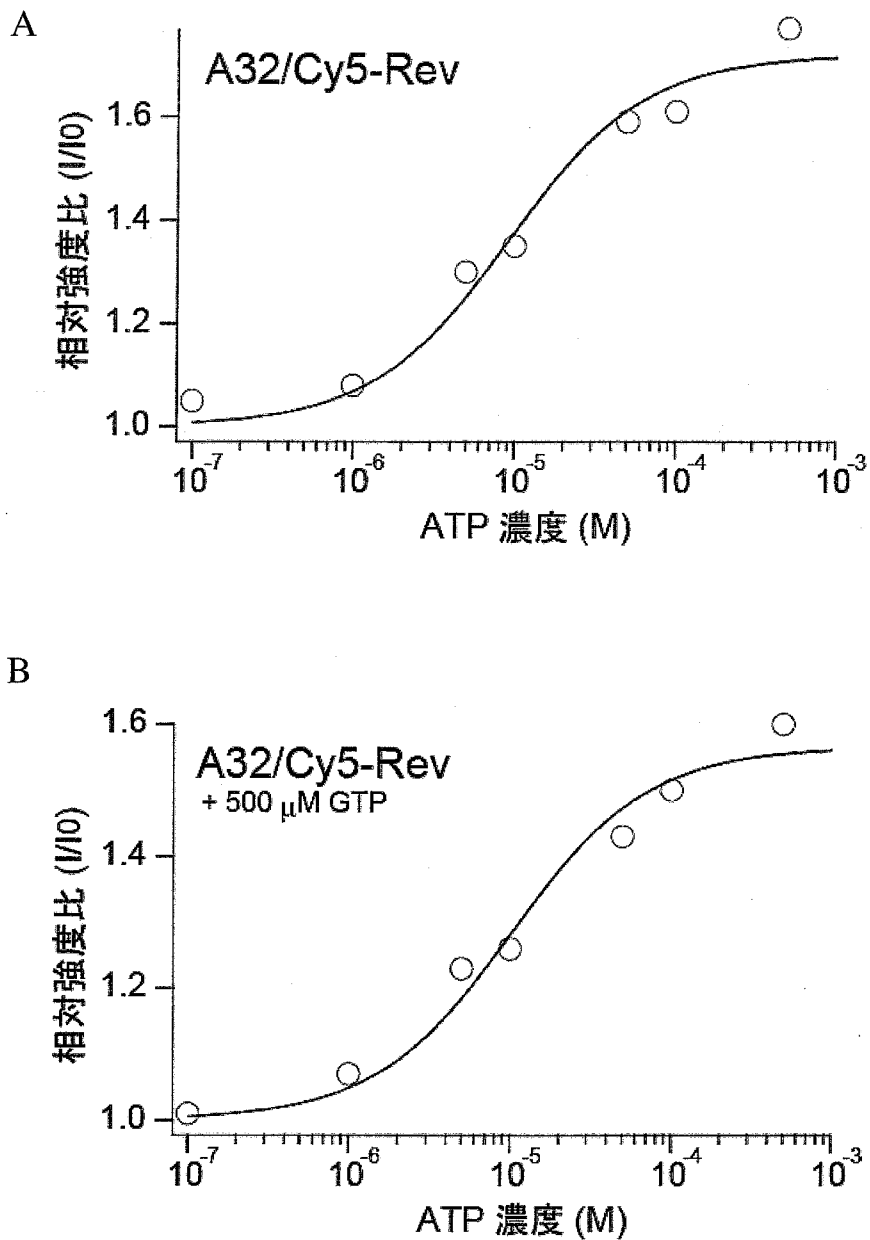


図 3-23 蛍光強度により算出した A32/Cy5-Rev の GTP 存在、非存在下での ATP 結合飽和曲線

ATP 滴定による蛍光強度変化により算出した(A) GTP 非存在下、(B) 500 μM GTP 存在下における A32/Cy5-Rev の ATP 飽和曲線を示す。理論式に基づいて近似した曲線を示している。

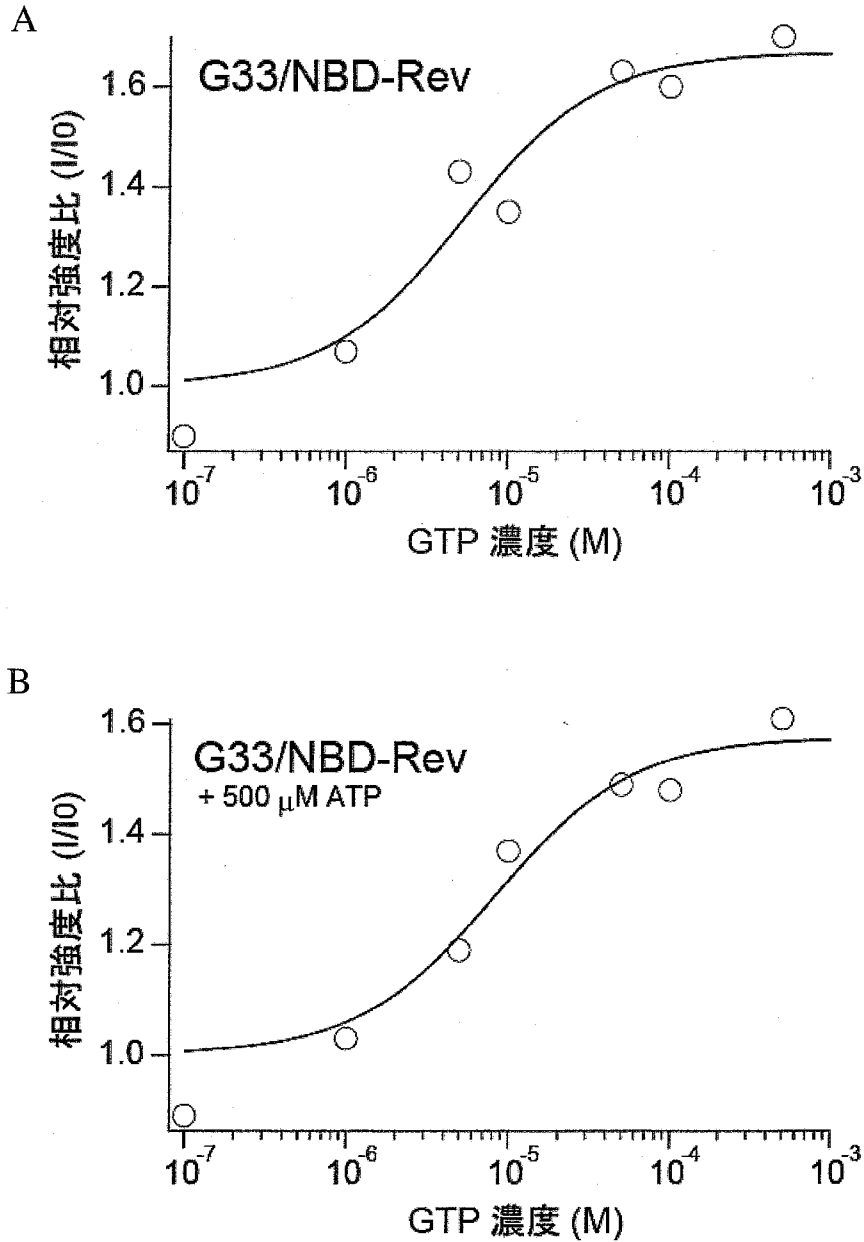


図 3-24 蛍光強度により算出した G33/NBD-Rev の GTP 存在、非存在下での GTP 結合飽和曲線

GTP 滴定による蛍光強度変化により算出した(A) ATP 非存在下、(B) 500 μM ATP 存在下における G33/NBD-Rev の GTP 飽和曲線を示す。理論式に基づいて近似した曲線を示している。

考察

RNP を骨格として蛍光性センサーを作製する本方法論では、RNA サブユニットとペプチドサブユニットが非共有結合で複合体を形成しているため、蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを容易に交換することができる。そのため、RNA サブユニットライブラリーと様々な励起・発光波長で応答する蛍光性ペプチドサブユニットライブラリーを組み合わせることで、目的とする蛍光特性を有するセンサーを簡便なスクリーニングにより得ることができた。

各種蛍光修飾 Rev ペプチドを用いて相対強度比を算出した結果、同一の RNA サブユニットを用いた場合でも、ペプチドサブユニットに化学修飾する蛍光分子の種類を変えることで、相対強度比の値が変化する RNP センサーが確認された。この結果は、蛍光センサーの光学的な応答を予測することが困難であることを示している。本章で選択された ATP 結合性 RNP リセプターの塩基配列から、ATP 結合場が Rev ペプチド N 末端に対して様々な位置に存在していると予測される。しかしながら、ほとんどすべての蛍光性 RNP が ATP 添加に伴い蛍光強度変化を示した。この結果から、RNA サブユニットが形成する ATP 結合場の位置が蛍光分子を修飾した Rev ペプチドの N 末端の近傍に存在しなくても、ATP との結合に伴い蛍光強度が変化していると考えられる。つまり、ATP 応答性蛍光 RNP センサーは、ATP との結合に伴い RNA サブユニットの構造変化が誘起され、蛍光分子周辺の環境が変化することにより蛍光強度が変化していると考えられる。このことから、リセプターの詳細な三次元構造情報をもとにして、蛍光分子を導入する最適な位置を予測することが困難であることが伺える。従って、蛍光 RNP ライブラリーから簡便なスクリーニングにより様々な蛍光特性を有するセンサーを選択する本方法論は、テーラメイド蛍光センサーを作製する上で非常に有利であると考えられる。

本方法論により得られる ATP 結合性蛍光 RNP センサーを組み合わせることで、幅広い濃度領域の標的分子を検出することができる。従来の方法では、広範囲の濃度領域で存在する標的物質を検出するためには、詳細な三次元構造情報をもとに点変異を導入することにより、元のリセプターの標的分子に対する親和性を低下させる方法で行われてきた³⁴⁻³⁸。しかしながら本方法論では、ライブラリー化した RNA サブユニットにより形成された RNP ライブラリーから、標的分子に対して結合能を有する RNP リセプターを選択するだけで、標的分子に対する親和性が

多様な RNP リセプターライブラリーを得ることができる。このような RNP リセプターが容易に選択できることは、テーラーメイド蛍光性センサーを作製する上で非常に有利である。また、本章では蛍光分子と Rev ペプチドの間にリンカー分子を導入することにより、相対強度比の値が増加する RNP センサーを得ることができた。この結果は、様々なリンカー分子を導入することにより、蛍光 RNP センサーの更なる最適化が可能であることを示している。

これらの結果より、最適な蛍光特性を有する蛍光性 RNP センサーを選択することにより、細胞抽出液に見られるようなサンプル中に含まれている蛍光性分子に阻害されることなく、多種の標的分子を高感度に検出することが可能であると考えられる。最適な蛍光 RNP センサーを一度構築してしまえば、RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドサブユニットを共有結合で安定化することで、より安定な蛍光 RNP センサーが作製できる。このような安定な蛍光 RNP センサーは、基盤表面に固定された相補的な DNA プローブ^{39,40}とハイブリダイゼーションさせることにより RNP センサーマイクロアレイにも応用できると期待される。

結論

ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに蛍光分子を導入することにより、リセプターの性能を失うことなく ATP 応答性蛍光 RNP センサーに機能改変できることを明らかにした。ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットライブラリーと、蛍光修飾 Rev ペプチドから形成される蛍光性 RNP ライブラリーから、相対蛍光強度比が大きな値を示す ATP 応答性蛍光 RNP センサーをスクリーニングできることを明らかにした。また、このライブラリーからは幅広い ATP 濃度領域で様々な波長で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることができた。加えて、ATP 応答性蛍光 RNP センサーの作製方法と同様の方法を用いて GTP 応答性蛍光 RNP センサーを作製した。GTP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットライブラリーと、蛍光修飾 Rev ペプチドから形成される蛍光性 RNP ライブラリーから、ATP 応答性蛍光 RNP センサーと同様に、様々な励起・発光波長、幅広い濃度領域で応答する GTP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることができた。この方法論で作製した ATP、GTP 応答性蛍光 RNP センサーは塩基選択的な応答を示すことを明らかにした。この塩基選択的な応答を利用することにより、作製した ATP 応答性蛍光 RNP センサー、GTP 応答性蛍光 RNP センサーを用いて、ATP、GTP 共存溶液中の ATP、GTP を異なる波長で定量的に検出できることを明らかにした。以上の結果より、RNP を基本骨格として、RNA サブユニットライブラリー、蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを組み合わせた蛍光性 RNP ライブラリーから簡便なスクリーニングを行うことにより、望みとする基質結合および発光特性を有するテララーメイド蛍光 RNP センサーを構築できることを明らかにした。

実験の部

試薬

ATP アガロース樹脂 (4 % beaded アガロース固定)、GTP アガロース樹脂 (4 % beaded アガロース固定)、ヌクレオチド (ATP、UTP、CTP、GTP) は Sigma-Aldrich 社から購入した。側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸は Novabiochem 社から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂、HATU (*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) は Applied Biosystems 社から、ペプチド合成用 DMF は和光純薬から購入した。4-fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD fluoride), 1-pyrenesulfonyl chloride、7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid、Dansyl chloride、Dapoxyl sulfonyl chloride、6-carboxyfluorescein-succinimidyl ester は Molecular Probes 社から購入した。Cy5 mono NHS ester は Amersham Bioscience から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI)、T4 RNA リガーゼは New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。ライブラリー作成用 DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素 (AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase) は Promega 社から購入した。RNA 転写キット (Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit) は Epicentre 社から購入した。Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar は Difco 社より購入した。DNA ライブラリー、PCR プライマー用の DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。放射性アイソトープは Amersham Pharmacia 社から購入した。QIAprep Spin Mini Prep Kit は Qiagen 社から購入した。スピンカラム SUPREC-01 は TaKaRa 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

蛍光修飾 Rev ペプチドの合成

Rev ペプチドは Simadzu PSSM-8 ペプチド合成機を用いて、Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.41 mmol/g) 用いた。縮合は、樹脂に対して 5 当量の Fmoc アミノ酸、5 当量の HATU を 5 % のジイソプロピルエチルアミン (DIEA) を含む DMF に溶解したものを加え、60 分攪拌することで行った。ペプチドの N 末端の Fmoc 基を樹脂上で除去し

た後、それぞれの活性化された蛍光分子 (NBD fluoride, 1-pyrenesulfonyl chloride, Dansyl chloride, Dapoxysulfonyl chloride, 6-carboxyfluorescein-succinimidyl ester, Cy5 mono NHS ester) を 5% DIEA (v/v) を含む DMF 中でカップリングした。7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid においては 5% DIEA (v/v)、HATU を含む DMF 中でカップリングを行った。蛍光修飾したペプチドの樹脂からの切り出し及び脱保護は、氷上、窒素雰囲気下にてフェノール (0.75 g)、チオアニソール (0.5 ml)、エタンジチオール (0.25 ml)、水 (0.5 ml)、トリフルオロ酢酸 (10 ml) の混合溶液を乾燥させた樹脂に加え、窒素雰囲気下、氷上にて 3 時間攪拌することにより行った。その後、ゲルろ過樹脂 G-10 (Amersham Pharmacia) を用いて粗精製を行い、逆相 HPLC により精製を行った。精製したペプチドは Voyager MALDI-TOF マススペクトル (Applied Biosystems) を用いて同定を行った。蛍光修飾ペプチドの濃度はアミノ酸組成分析により決定した。

RNP リセプターの選択方法

RNA ライブラリーの作製は第二章の方法に従った。ATP 結合性 RNP リセプター及び、GTP 結合性 RNP リセプターは以下の方法で選択を行った。結合実験には 4% beaded アガロース固定された ATP 固定化アガロース樹脂、GTP 固定化アガロース樹脂を用いた。樹脂はあらかじめ、結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005% Tween20) により、樹脂容量の 3 倍量の結合バッファーで 3 回洗浄することにより平衡化した。50 µl 容量の ATP 樹脂または GTP 樹脂と、1 µM の RNA、1.5 µM Rev ペプチド混合液 100 µl をスピンカラム SUPREC-01 に加え、氷上で 30 分間時々攪拌しながら結合させた。結合反応後、遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) を行い、非結合画分を除去した。300 µl の結合バッファーを加え、遠心分離 (5000 g、1 分間、4 °C) する操作を 3 回繰り返し、樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNA は、4 mM ATP を含んだ結合バッファー 100 µl で溶出させ、これを 3 回繰り返した。回収した溶液は酢酸アンモニウム存在下エタノール沈殿を行い、RNA を回収した。回収した RNA の DNA への逆転写反応、PCR による増幅、RNA への転写反応は第二章で示した方法に従った。

ATP 固定化アガロース樹脂の有効濃度算出

ATP が固定化された樹脂を含む結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、10

mM MgCl₂、50 µg/ml tRNA、0.005 % Tween 20) 中、放射線標識した A23 RNA を、結合が飽和に達するまで結合させた。1 分子の ATP に対して 1 分子の RNA が結合すると仮定して、樹脂に固定化された ATP の有効基質濃度を算出した。その結果、ATP 固定化アガロース樹脂の有効 ATP 濃度は 73.6 nmol/ml 樹脂容量であった。

ATP 樹脂を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合能評価

各樹脂量の ATP 固定化アガロース樹脂と RNA (最終濃度 1 µM) とペプチド (最終濃度 1 µM) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、10 mM KCl、10 mM MgCl₂) をスピンカラム SUPREC-01 に加え、室温下 30 分間反応させた。反応液を遠心分離 (5,000 g、1 分間、4 °C) により濾過した後、300 µl の結合バッファーを加え遠心分離 (5000 g、1 分間、4 °C) する操作を 3 回繰り返し、樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNA は、10 mM ATP を含んだバッファー 100 µl で溶出させ、これを 3 回繰り返しした。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分 (%)、特異的結合画分 (%)、非特異的結合画分 (%) を算出した。データは平均±標準偏差により表記した。RNP リセプターの ATP との解離定数 K_d は、以下の理論式[1]に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$f = \frac{[RNP] + [ATP]}{[RNP]_T}$$
$$= \frac{([RNP]_T + [ATP]_T + K_D) / 2 + \sqrt{([RNP]_T + [ATP]_T + K_D)^2 - 4[RNP]_T[ATP]_T}}{2[RNP]_T} \quad [1]$$

f は ATP に結合した RNP の結合割合、[] は濃度、[RNP]_T は全 RNP 濃度、[ATP]_T は全 ATP 濃度を示す。

ATP 樹脂を用いた ATP 結合性 RNP リセプターの塩基選択性評価

樹脂量 20 µl 分の ATP 固定化アガロース樹脂と、RNA (最終濃度 1 µM)、Rev ペプチド (最終濃度 1 µM)、各濃度の競合剤を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005 % Tween 20) 40 µl をスピンカラム SUPREC-01 に加え、室温下 30 分間反応させた。以下、ATP 結合能評価の方法に従い結合割合を算出した。

蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトルは Hitachi 社製 F-4500 蛍光スペクトル測定装置を用いて測定した。励起、発光バンド幅は 5 nm、測定温度は 20°Cで行った。全測定は 300 μ l のバッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂) 中に各蛍光性 RNP 複合体 0.5 μ M もしくは 0.1 μ M を含むサンプル溶液を調整し測定を行った。励起波長は Pyr-Rev (357 nm)、7mC-Rev (360 nm)、7mGC-Rev (360 nm) を用いた。

蛍光強度測定結果を基にした解離定数の算出

蛍光強度測定結果を基にした解離定数 K_D の算出は、以下の理論式[2]に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$F_{\text{obs}} = A \left(\frac{([FRNP]_T + [ATP]_T + K_D) - \left(\left([FRNP]_T + [ATP]_T + K_D \right)^2 - 4[FRNP]_T [ATP]_T \right)^{1/2}}{2[FRNP]_T} \right) \quad [2]$$

A は結合が飽和する時の ATP 濃度における蛍光強度 ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) を示している。 K_D は解離定数、 $[FRNP]_T$ は蛍光性 RNP の濃度、 $[ATP]_T$ は ATP 濃度を示している。

蛍光マイクロプレートリーダーを用いた蛍光強度測定

96 ウェルマイクロプレートリーダーを用いた蛍光測定は、Wallac ARV0sx 1420 マルチプレートカウンター (Perkin Elmer 社) により測定を行った。1 μ M 蛍光性 RNP を含む結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂) に、各濃度の基質を加えた結合反応溶液 100 μ l をマイクロタイタープレートに加え、数分穏やかに攪拌した後、30 分間インキュベートした。発光スペクトルの測定はそれぞれの蛍光分子に最適なフィルターを用いて行った。フィルターは、Pyr-Rev (355, 390 nm)、7mC-Rev (355, 390 nm)、Dan-Rev (475, 535 nm)、Dapoxy-Rev (475, 535 nm)、NBD-Rev (475, 535 nm)、6FAM-Rev (475, 535 nm)、Cy5-Rev (650, 670nm) を用いた。各ウェルの蛍光強度イメージ図と、その図で用いた蛍光強度を示した色は Wallac 1420 software ver. 2.00 を用いて作製した。

引用文献

- (1) Pollack, S. J.; Nakayama, G. R.; Schultz, P. G. *Science* **1988**, *242*, 1038.
- (2) Renard, M.; Belkadi, L.; Hugo, N.; England, P.; Altschuh, D.; Bedouelle, H. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 429.
- (3) Gilardi, G.; Zhou, L. Q.; Hibbert, L.; Cass, A. E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3840.
- (4) de Lorimier, R. M.; Smith, J. J.; Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Sali, K. M.; Paavola, C. D.; Rizk, S. S.; Sadigov, S.; Conrad, D. W.; Loew, L.; Hellinga, H. W. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2655.
- (5) Marvin, J. S.; Corcoran, E. E.; Hattangadi, N. A.; Zhang, J. V.; Gere, S. A.; Hellinga, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4366.
- (6) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12065.
- (7) Benson, D. E.; Conrad, D. W.; de Lorimier, R. M.; Trammell, S. A.; Hellinga, H. W. *Science* **2001**, *293*, 1641.
- (8) Morii, T.; Sugimoto, K.; Makino, K.; Otsuka, M.; Imoto, K.; Mori, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1138.
- (9) Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628.
- (10) Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.
- (11) Jhaveri, S.; Rajendran, M.; Ellington, A. D. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1293.
- (12) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547.
- (13) Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469.
- (14) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928.
- (15) Fang, X. H.; Cao, Z. H.; Beck, T.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5752.
- (16) Stojanovic, M. N.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9678.
- (17) Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- (18) Stojanovic, M. N.; Green, E. G.; Semova, S.; Nikic, D. B.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6085.

- (19) Stojanovic, M. N.; Kolpashchikov, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9266.
- (20) Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3429.
- (21) Ho, H. A.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384.
- (22) Kirby, R.; Cho, E. J.; Gehrke, B.; Bayer, T.; Park, Y. S.; Neikirk, D. P.; McDevitt, J. T.; Ellington, A. D. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4066.
- (23) Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3194.
- (24) Jiang, Y. X.; Fang, X. H.; Bai, C. L. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5230.
- (25) Nutiu, R.; Li, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1061.
- (26) Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *127*, 12766.
- (27) Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.
- (28) Fazakerley, G. V.; Russell, J. C.; Wolfe, M. A. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *76*, 601.
- (29) Sheldrick, W. S.; Rieke, E. *Acta Crystallogr.* **1978**, *B34*, 2324.
- (30) Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhandiram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.
- (31) Ellington, A. D. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 427.
- (32) Gold, L.; Polisky, B.; Uhlenbeck, O.; Yarus, M. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763.
- (33) Jennifer F. Lee, J. F.; Hesselberth, J. R.; Meyers, L. A.; Ellington, A. D. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D95.
- (34) de Lorimier, R. M.; Smith, J. J.; Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Sali, K. M.; Paavola, C. D.; Rizk, S. S.; Sadigov, S.; Conrad, D. W.; Loew, L.; Hellinga, H. W. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2655.
- (35) Marvin, J. S.; Corcoran, E. E.; Hattangadi, N. A.; Zhang, J. V.; Gere, S.A.; Hellinga, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 4366.
- (36) Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12065.
- (37) Benson, D. E.; Conrad, D. W.; de Lorimier, R. M.; Trammell, S. A.; Hellinga, H. W. *Science* **2001**, *293*, 1641.
- (38) Morii, T.; Sugimoto, K.; Makino, K.; Otsuka, M.; Imoto, K.; Mori, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1138.

(39) Weng, S.; Gu, K.; Hammond, P. W.; Lohse, P.; Rise, C.; Wagner, R. W.; Wright, M. C.; Kuimelis, R. *G. Proteomics* **2002**, *2*, 48.

(40) Collett, J. R.; Cho, E. J.; Ellington, A. D. *Methods* **2005**, *37*, 4.

第四章

基質結合配向性を制御した RNA-ペプチド複合体リセプターの構築

4-1 基質の結合配向性を制御した RNP リセプターの構築

天然の酵素には、厳密な基質の配向性をもとにして優れた反応選択性を発揮する基質結合場及び化学反応場が存在する。しかしながら、従来の、化学反応の遷移状態アナログ分子に結合する生体高分子リセプターの作製によるテーラーメイド酵素創製の方法論^{1,2}では、このような特徴はデザインできない。この方法論を応用し、生体高分子リセプターに厳密な配向性のもとに基質が結合する活性中心を設計できれば、天然の酵素に比べても遜色のない触媒活性を発揮するテーラーメイド酵素が作製できると考えられる。現在までの *in vitro* セレクション法³を適用した RNA アプタマー^{4,15}及び RNA-ペプチド複合体 (リボヌクレオペプチド、RNP) リセプター¹⁶の作製方法は、基質分子に対する結合活性のみを選択圧として目的分子を選択してきた。そこで本章では、RNP のペプチドサブユニットを応用した *in vitro* セレクションを行い、Rev ペプチド N 末端近傍において、特定の配向で基質が結合する RNP リセプターを構築する方法論の開発を行った。

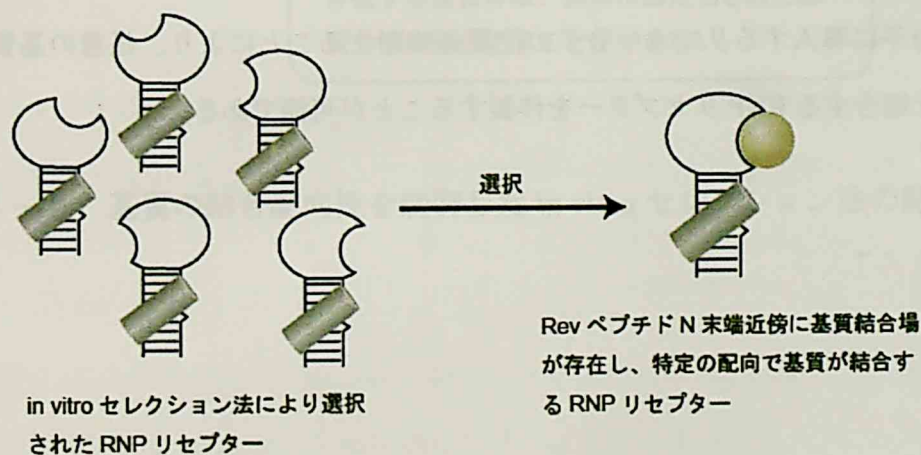


図 4-1 基質結合配向性を制御した RNP リセプターの選択

4-1-1 基質の結合配向性を制御した *in vitro* セレクション法の開発

RNA サブユニットに *in vitro* セレクション法を適用した ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法¹⁶は、アガロースに固定化された ATP に対して結合活性を有する RNP を回収する方法で行われた。上記方法論で選択された RNA サブユニットの塩基配列は、本論文の第二章及び第三章で選択された RNA サブユニットにみられるように、保存配列がランダム領域内の多様な位置に存在していた。ATP に対する結合活性のみを選択圧として RNP リセプターを選択する方法では、選択された各 RNA サブユニットの ATP 結合場が Rev ペプチド N 末端に対してそれぞれ異なる位置で形成されていると考えられる。そこで本章では、基質結合場が形成される位置及び、基質結合配向性を制御した RNP リセプターの選択を可能とする *in vitro* セレクション法の開発を行った。この方法論を開発するため、RNP リセプターのペプチドサブユニットを利用した。Rev ペプチドの N 末端にリンカー分子を介して基質分子を化学修飾し、RNA サブユニットと複合体を形成させることで、Rev ペプチド N 末端近傍に基質が存在している状態を作り出すことができる。基質結合場が Rev ペプチド N 末端近傍に存在している RNA サブユニットは、基質修飾 Rev ペプチドと複合体を形成することで、ペプチドに化学修飾された基質分子と相互作用する。この複合体は、アガロースなどの担体に固定化された基質分子に対して結合反応を行うと、基質結合場がすでに基質と相互作用しているため、担体に固定化された基質との結合が阻害されると予想される (図 4-2)。この方法を用いることにより、基質結合場が Rev ペプチドの N 末端近傍に存在した RNP リセプターの選択が可能であると考えられる。また本方法論では、基質分子に導入するリンカー分子の位置を検討することにより、任意の基質結合配向性で基質分子と結合する RNP リセプターを作製することが可能である。

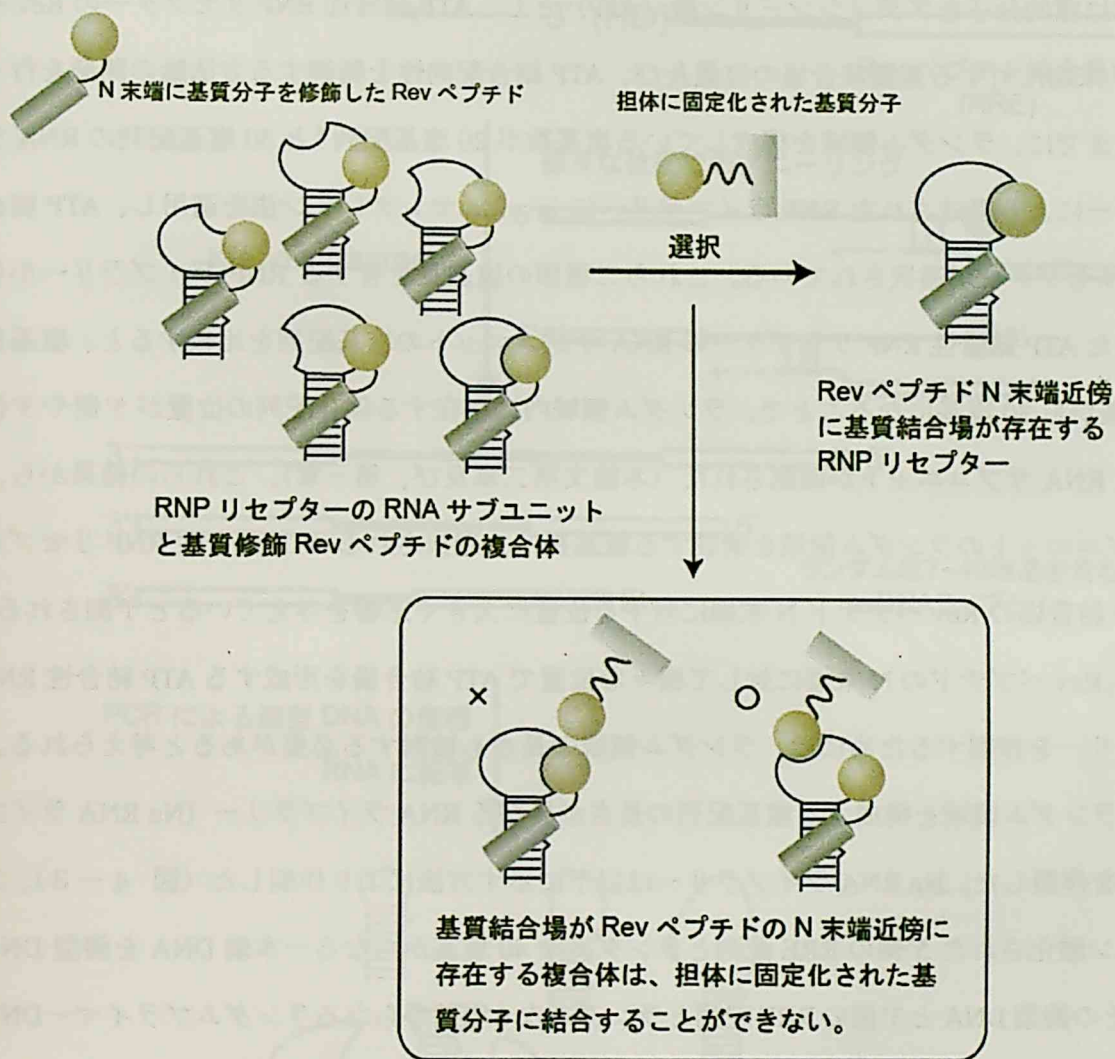


図 4-2 基質の結合配向性を制御した *in vitro* セレクション法の開発

4-2 ATP 結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターの構築

4-2-1 ランダム領域の長さの異なる RNA ライブラリーの作製

本章では標的分子をアデノシン三リン酸 (ATP) とし、ATP 結合性 RNP リセプターの Rev ペプチド N 末端に対する基質結合場の位置及び、ATP 結合配向性を制御する方法論の開発を行った。現在までに、ランダム領域を構成している塩基数が 20 塩基配列⁴と 30 塩基配列の RNA ライブラリーにより形成された RNP ライブラリーに *in vitro* セレクション法を適用し、ATP 結合性 RNP リセプターが選択されている。これら二種類の塩基長を有する RNP ライブラリーから選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットの塩基配列を比較すると、塩基長が 20 塩基から 30 塩基になることで、ランダム領域内に存在する保存配列の位置が 5'側や 3'側に偏った RNA サブユニットが確認された (本論文第二章及び、第三章)。これらの結果から、RNA サブユニットのランダム領域を構成する塩基長は、選択される ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合場の Rev ペプチド N 末端に対する位置に大きく影響を与えていると予測される。そのため、Rev ペプチドの N 末端に対して様々な位置で ATP 結合場を形成する ATP 結合性 RNP ライブラリーを作製するためには、ランダム領域の長さも検討する必要があると考えられる。そこで、ランダム領域を構成する塩基配列の長さが異なる RNA ライブラリー (Nn RNA ライブラリー) を作製した。Nn RNA ライブラリーは以下に示す方法により作製した (図 4-3)。3'末端がリン酸化された 5'側の RRE 配列とランダムな 40 塩基からなる一本鎖 DNA を鋳型 DNA とした。その鋳型 DNA と 3'側の RRE 配列とランダムな 6 塩基からなるランダムプライマー DNA を用いて相補鎖を形成させた後、Klenow DNA ポリメラーゼを用いて伸長反応を行った。鋳型 DNA、ランダムプライマー DNA ともランダムな領域を含んでいるため、それぞれが相補鎖を形成する場所により長さの異なる (7~40 塩基) 一本鎖 DNA ライブラリーが作製できる。鋳型 DNA は 3'末端をリン酸化されているため、Klenow DNA ポリメラーゼによる伸長反応が阻害される。伸長反応後の一本鎖 DNA ライブラリーを鋳型 DNA として、両末端の RRE 配列を含むプライマーを用いて PCR 反応により増幅し、長さの異なる二本鎖 DNA ライブラリーを作製した。その後、増幅した二本鎖 DNA を鋳型とし、RNA に転写反応を行うことで Nn RNA ライブラリーを作製した。

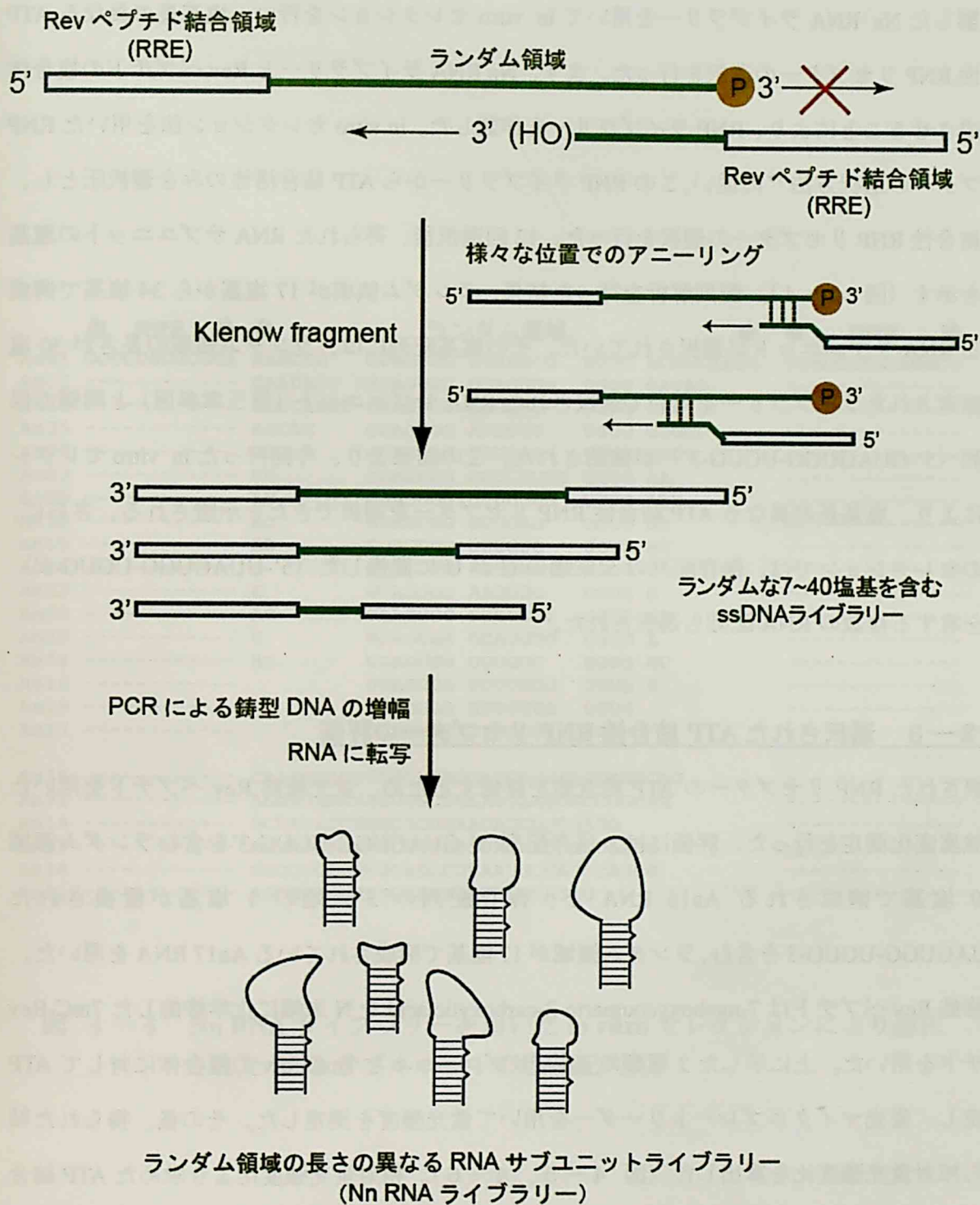


図 4-3 Nn RNA ライブラリーの作製方法

4-2-2 Nn RNA ライブラリーを用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択

作製した Nn RNA ライブラリーを用いて *in vitro* セレクションを行い、塩基長の異なる ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。まず、Nn RNA ライブラリーと Rev ペプチドの複合体を形成させることにより、RNP ライブラリーを作製した。*in vitro* セレクション法を用いた RNP リセプターの選択方法¹⁶に従い、この RNP ライブラリーから ATP 結合活性のみを選択圧とし、ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。12 回選択後、得られた RNA サブユニットの塩基配列を示す (図 4-4)。配列解析を行った結果、ランダム領域が 17 塩基から 34 塩基で構成される RNA サブユニットが選択されていた。その塩基配列には、ランダム領域の長さが 30 塩基に固定されたライブラリーを用いて選択された RNA サブユニット (第三章参照) と同様の保存配列 (5'-GUAGUGG-UGUG-3') が確認された。この結果より、今回行った *in vitro* セレクションにより、塩基長の異なる ATP 結合性 RNP リセプターを選択できたと示唆される。さらに、今回のセレクションでは、保存配列の 5'末端の G が U に置換した (5'-UUAGUGG-UGUG-3') 配列を有する複数の RNA 配列も選択された。

4-2-3 選択された ATP 結合性 RNP リセプターの評価

選択された RNP リセプターの ATP 結合能を評価するため、蛍光修飾 Rev ペプチドを用いた蛍光強度変化測定を行った。評価には、保存配列 5'-GUAGUGG-UGUG-3' を含むランダム領域が 19 塩基で構成される An16 RNA と、保存配列の 5'末端の 1 塩基が置換された 5'-UUAGUGG-UGUG-3' を含む、ランダム領域が 17 塩基で構成されている An17 RNA を用いた。蛍光修飾 Rev ペプチドは 7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid を N 末端に化学修飾した 7mC-Rev ペプチドを用いた。上に示した 2 種類の RNA サブユニットと 7mC-Rev の複合体に対して ATP を滴定し、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。その後、得られた結果から相対蛍光強度比を算出した (図 4-5、4-6)。相対蛍光強度比より求めた ATP 結合飽和曲線の解析により、An16 RNA/7mC-Rev と ATP の解離定数は $K_D = 6.22 \mu\text{M}$ であった (図 4-5)。同様の方法で算出した An17 RNA/7mC-Rev と ATP の解離定数は $K_D = 1.83 \mu\text{M}$ であった (図 4-6)。これらの結果より、今回行った Nn RNA ライブラリーを用いた *in vitro* セレクションにより、長さの異なる ATP 結合性 RNP リセプターが選択されたことが明らかになった。

	◀ RRE ▶	◀	ランダム領域	▶	◀ RRE ▶	▶
An01	GGUCUGGGCGCA	AAGCUG	GUAGUGG GUAAGCG	UGUG ACAGCAAGA	UGACGGUACAGGCC	
An02	-----	CAAUAUC	GUAGUGG UGAGGUG	UGUG GAUUAU	-----	
An30	-----	AGUCAAUC	GUAGUGG ACUGUG	UGUG GAU	-----	
An35	-----	AUCAC	GUAGUGG AUUGUG	UGUG GUGGU	-----	
An29	-----	GCU	GUAGUGG UUGUG	UGUG AGU	-----	
An03	-----	UU	GUAGUGG UUUUGUG	UGUG AA	-----	
An08	-----	AU	GUAGUGG UUUUGUG	UGUG AUU	-----	
An18	-----	AC	GUAGUGG GUUGAG	UGUG GU	-----	
An15	-----	AU	GUAGUGG UUGUG	UGUG AU	-----	
An16	-----	C	GUAGUGG UGUGUG	UGUG G	-----	
An33	-----	C	GUAGUGG AAUGUG	UGUG G	-----	
An09	-----	AC	GAAGUGG UUUUGAG	UGUG GU	-----	
An22	-----	U	GCAGUGG GUAUGUG	UGUG A	-----	
An34	-----	AC	UUAGUGG UUGUG	UGUG GU	-----	
An10	-----		UUAGUGG UUUUGUG	UGUG U	-----	
An19	-----		UUAGUGG UUUUGUG	UGUG	-----	
An17	-----		UUAGUGG UUGUG	UGUG	-----	
An26	-----	CAACGUAUUUUGCUGGGCGAUCUGGCACUAGUCAG			-----	
An31	-----	AGUUGAAAUACUUGCGUAAUUAAGUGCCGGUAG			-----	
An14	-----	GCUAUACCUUGCGCUGAAUAUCGUCGAGG			-----	
An25	-----	GAUUGGAAUAUCUCGUCGUAGUAUCGUUAGUG			-----	
An36	-----	GUCGCGGUUUCAGCCUUAAGCUAGGCAUCG			-----	
An21	-----	AGCCGUUUCUGCGUGAAAUUCGCAUCG			-----	

図 4-4 Nn RNA ライブラリーを用いた *in vitro* セレクションにより選択された RNA サブユニットの塩基配列

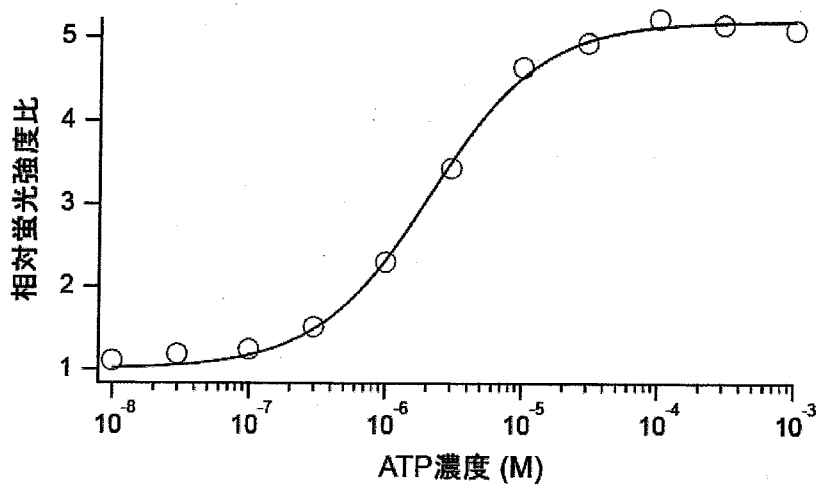


図 4-5 An16 RNA/7mC-Rev 複合体の蛍光強度測定による ATP 結合評価

An16 RNA/7mC-Rev 複合体の ATP に対する結合飽和曲線を示す。理論式に基づいて近似した曲線を示している。

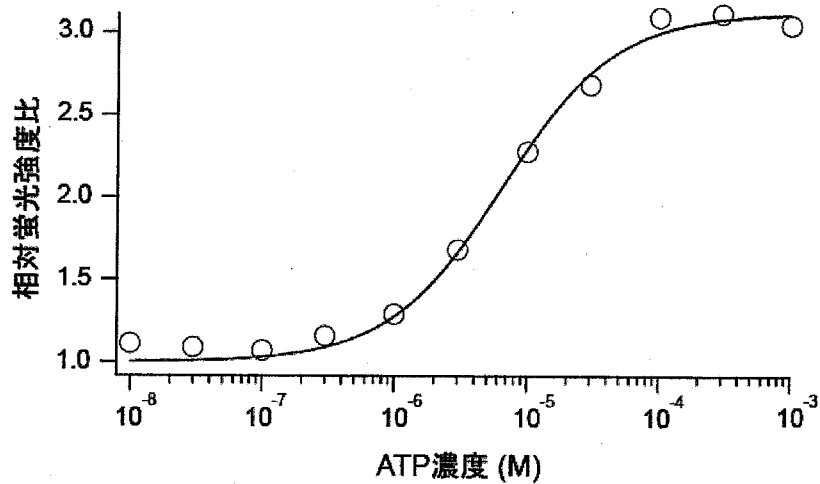


図 4-6 An17 RNA/7mC-Rev 複合体の蛍光強度測定による ATP 結合評価

An17 RNA/7mC-Rev 複合体の ATP に対する結合飽和曲線を示す。理論式に基づいて近似した曲線を示している。

4-2-4 N末端にATPを化学修飾したRevペプチドの合成

基質の結合配向性を制御したRNPリセプターを作製するためには、RevペプチドのN末端に基質分子を化学修飾した基質修飾Revペプチドが必要である。そこで、RevペプチドN末端にATPを化学修飾したペプチドの合成を行った。合成スキームを以下に示す(図4-7)^{17, 18}。まず、RevペプチドのN末端にリンカー分子としてGly残基を導入したGRevペプチドをFmoc固相合成法により合成した。その後、樹脂上でプロモ酢酸を縮合した。続いて、合成ペプチドの樹脂からの切り出し及び脱保護反応を行い、HPLCにより精製を行った。精製したペプチドにAdenosine 5'-[γ-thio]triphosphate (ATP γ S)を反応させることにより、ATPを γ 位のリン酸基を介して合成ペプチドと結合させた。この操作により、基質ATPのリン酸基とRevペプチドがリンカー分子を介して共有結合で繋がれたATP-GRevペプチドを合成した。

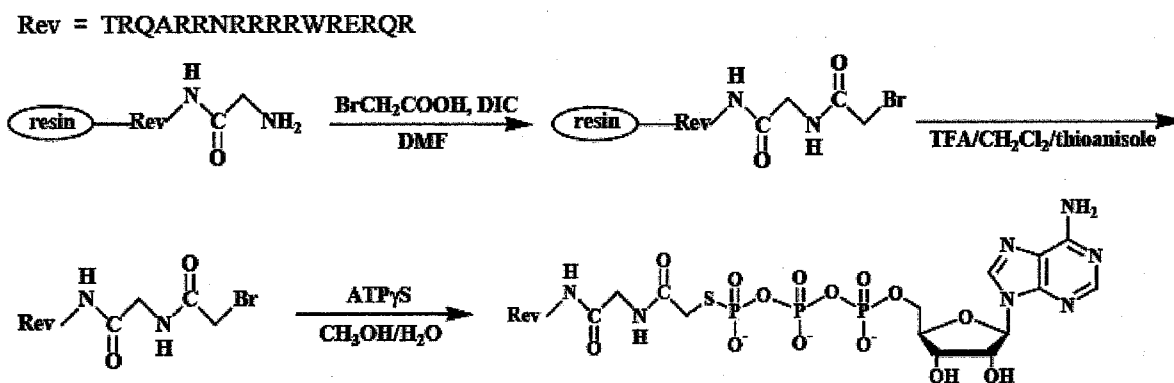


図 4-7 ATP-GRev ペプチドの合成スキーム

4-2-5 ATP 修飾 Rev ペプチドを用いた ATP 結合配向性を制御したセレクション

Nn RNA ライブラリーを用いた *in vitro* セレクションにより選択された RNP リセプターの中から、Rev ペプチドの N 末端近傍及び、特定の配向で ATP と相互作用する ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った (図 4-8)。ATP-GRev ペプチドと複合体を形成した ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットは、ATP 結合場が Rev ペプチドの N 末端近傍に存在しているとペプチドに修飾された ATP と相互作用する。このため、アガロースに固定化された ATP への結合が阻害されると考えられる。そこで、ATP 結合配向性を制御したセレクションの第 1 ステップとして、選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA サブユニットと、ATP-GRev ペプチドの複合体を ATP 固定化アガロース樹脂に加え、結合反応を行い、非結合画分を回収した。この操作により、Rev ペプチド N 末端近傍以外に ATP 結合場が存在する RNA サブユニットを除去した。この方法では、ATP 結合活性のない RNP も選択されることになる。第 2 ステップでは第一ステップで回収した RNP から ATP 結合活性のある RNP を得るため、まずは RNA/ATP-GRev ペプチド複合体から RNA サブユニットの回収を行った。第 1 ステップで回収した溶液を陽イオン交換樹脂に加えることにより、RNA と複合体を形成している ATP-GRev ペプチドを除去し、RNA サブユニットのみを回収した。続いて第 3 ステップで、回収した RNA サブユニットに対して等量の Rev ペプチドを加え、再び RNP を形成させた後、ATP 固定化アガロース樹脂と結合反応を行った。結合反応後、非特異的に結合した分子を除き、ATP 結合活性のある RNP を回収した。回収した RNA を用いて逆転写反応を行い、PCR 法を用いて増幅させた。増幅した DNA を鋳型として転写反応を行い、次のサイクルの RNA ライブラリーを作製した。この一連の操作を繰り返し、Rev ペプチドの N 末端近傍、特定の配向で ATP と結合する ATP 結合性 RNP リセプターの選択を行った。

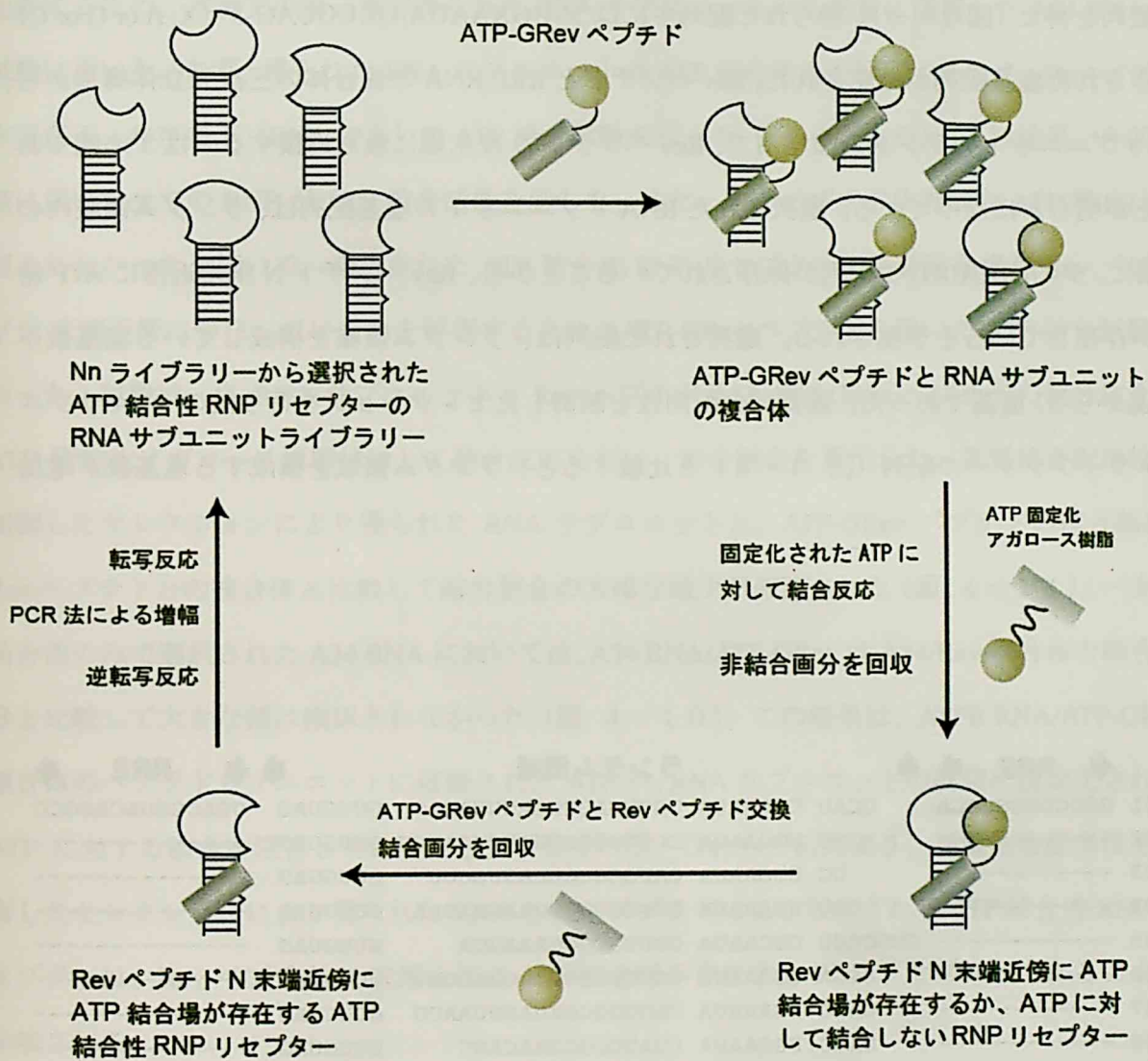


図 4-8 Rev ペプチド N 末端近傍に ATP 結合場が存在する ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法

4-2-6 ATP 結合配向性を制御したセレクションにより選択された

RNA の塩基配列

ATP-GRev ペプチドを用いた ATP 結合配向性を制御した in vitro セレクションを 6 サイクル行い、RNA サブユニットの塩基配列解析を行った。その結果、以下に示す RNA サブユニットの塩基配列を得た (図 4-9)。得られた配列中には 5'-UGXAAUA-GUUGUAG-3' (X: A or G or C) の保存された塩基配列が確認された。Rev ペプチドと RRE RNA の複合体の三次元立体構造から、RNA サブユニットのランダム領域内で、Rev ペプチドの N 末端に最も近接するのは 3' 末端であることが明らかになっている。選択された RNA サブユニットの塩基配列は、ランダム領域内の 3' 末端に、5'-GUUGUAG-3' 配列が保存されていることから、Rev ペプチド N 末端近傍に ATP 結合場が存在していると予測される。選択された配列は、ランダム領域を構成している塩基数が 33 塩基から 37 塩基であった。基質結合配向性を制御したセレクションを行う前の RNA サブユニットライブラリーの配列 (図 4-4) と比較すると、ランダム領域を構成する塩基数が増加していた。

	◀ RRE ▶	ランダム領域	▶ RRE ▶
ATPR01	GGUCUGGGCGCA	GCAU UGAAAUA UGCUGAGGCGAUUUACAG	GUUGUAG UGACGGUACAGGCC
ATPR02	-----	AGGU UGGAAUA CCUUGUGCGUAUGUAAUCU	GGUGUAG -----
ATPR03	-----	UC UGGAAUA CAUGC GCCUUAUUGCUU	GUUGUAG -----
ATPR04	-----	UGU UGAAAUA CUAGCGUCGGAAGUAGAA	GUUGUAG -----
ATPR05	-----	GUUCGGU UGCAAUA CCUUGCGCGAAAGCA	GUUGUAG -----
ATPR06	-----	AGGA UGGAAUU GCCUUGUGUUAGGAUUG	UUUGUAG -----
ATPR07	-----	UAUC UGAAAUA UAUGUGCGAUAGUAAUU	GUUGUAG -----
ATPR08	-----	UAGU UGGAAUA CUAUUCGCGAACAUU	GUUGUAG -----
ATPR09	-----	GGU UGGAAUA CCGCGCUGUUUAGUGU	GUUGUAG -----
ATPR10	-----	G UGCUAUA UGAUAGUCGUGCUGGCCGCUAGUAACG	-----

図 4-9 ATP-GRev ペプチドを用いたセレクションにより選択された RNA サブユニットの塩基配列

4-2-7 選択された ATP 結合性 RNP リセプターの ATP 結合能の評価

選択された RNA サブユニットの ATP 結合能を評価するため、ATP 樹脂を用いた結合試験を行った。RNA サブユニットは ATPR01、ATPR02、ATPR03、ATPR04、ATPR05、ATPR06 RNA を用いた (図 4-9)。また、基質結合配向性を制御していない ATP 結合性 RNP リセプターと比較するため、本論文の第三章で得られた RNA サブユニットから任意に選択した A34 RNA も試験に用いた。まず、得られた RNA サブユニットの ATP 結合活性を評価するため、Rev ペプチド存在下、非存在下 (RNA のみ) で ATP 結合試験を行った (図 4-10)。その結果、今回評価に用いた全ての RNP が ATP 結合活性を示した。また、Rev ペプチド依存的な ATP 結合は確認されなかった。続いて、選択された ATP 結合性 RNP リセプターの基質結合場が Rev ペプチド N 末端近傍に存在しているかを評価するため、ATP-GRev ペプチドを用いた ATP 結合試験を行った。試験は、各 RNA サブユニットと Rev ペプチド及び ATP-GRev ペプチドの複合体を、ATP 固定化アガロース樹脂に対して結合反応を行い、結合割合を算出した。基質結合配向性を制御したセレクションにより得られた RNA サブユニットと、ATP-GRev ペプチドの複合体は、Rev ペプチドとの複合体と比較して結合割合の大幅な減少が確認された (図 4-11)。一方、結合能のみで選択された A34 RNA においては、A34 RNA/ATP-GRev は A34/Rev 複合体の結合割合と比較して大きな差は確認されなかった (図 4-10)。この結果は、ATPR RNA/ATP-GRev 複合体のペプチドサブユニットに修飾された ATP が、RNA サブユニットの樹脂に固定化された ATP に対する結合を阻害していることを示している。これらの結果より、基質結合配向性を制御したセレクションにより得られた RNA と Rev ペプチドにより形成される ATP 結合性 RNP リセプターは、Rev ペプチド N 末端近傍に ATP 結合場が存在する RNP リセプターであることが示唆される。

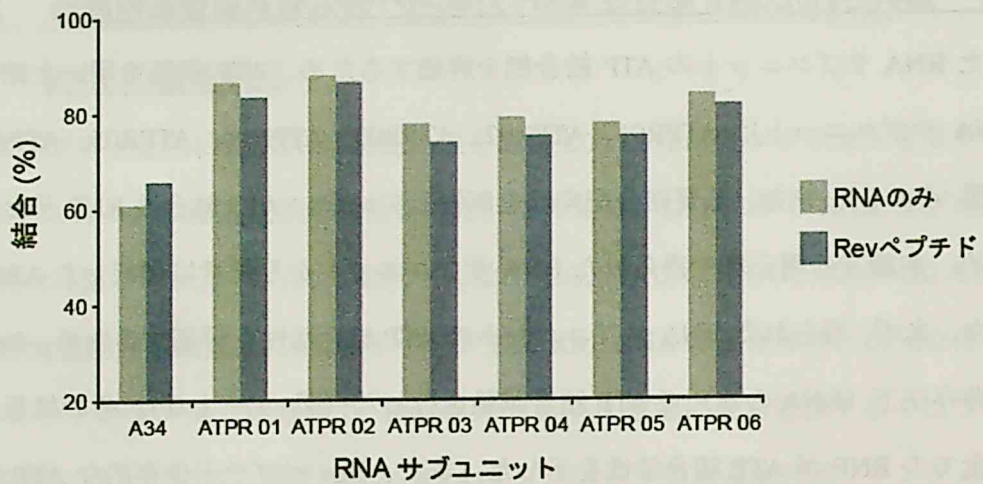


図 4-10 ATPR RNA/Rev ペプチド複合体を用いた ATP 結合試験

選択された RNA の Rev ペプチド存在下 (青色)、非存在下 (灰色) における ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合割合を示した。

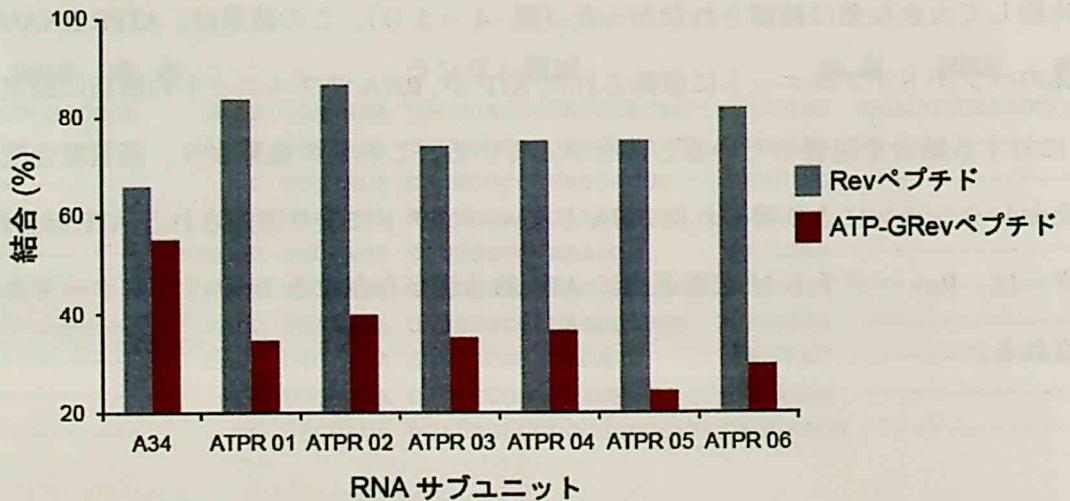


図 4-11 ATPR RNA/ATP-GRev ペプチド複合体を用いた ATP 結合試験

選択された RNA/Rev ペプチド複合体 (青色)、ATP-GRev ペプチド複合体 (紫色) の ATP 固定化アガロース樹脂に対する結合割合を示した。

考察

本章では、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットを利用することにより、ATP 結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターの選択が可能であることを示した。本論文第二章及び、第三章では、ペプチドサブユニットにランダムなアミノ酸により構成されるループ構造や、蛍光分子を導入することによりペプチドサブユニットをライブラリー化し、再び選択もしくはスクリーニングを行うことで RNP の高機能化及び機能改変が可能であることを示した。これらの方法論を用いれば確かに高機能な RNP を創製することができるが、異なるアプローチとして分子設計による機能性 RNP 創製の方法論が考えられる。分子設計による機能性 RNP を創製するためには、RNA、ペプチド、基質の三者間の詳細な位置情報が必要であり、また、それらの位置を人為的に操作できる方法論が必要である。本章で示した方法論を用いて得られた RNA サブユニットは、Rev ペプチド N 末端近傍で ATP と相互作用すると示唆される。この ATP 結合性 RNP リセプターの構造解析を行い、ATP 結合場の Rev ペプチド N 末端からの距離及び角度の詳細な構造情報を得ることで、分子設計により Rev ペプチド N 末端に触媒活性基を導入した RNP 酵素など、機能性 RNP の創製が期待できる。本章で用いた基質修飾 Rev ペプチドは、ATP の γ 位のリン酸基からリンカー分子を介して Rev ペプチドと連結した ATP-GRev ペプチドを用いたが、ATP のリボースや塩基部分にリンカーを導入することで、今回得られた RNA サブユニットとは異なる ATP 配向性で結合する RNP リセプターを、人為的に作製することが可能であると考えられる。また、本章で開発した基質結合配向性を制御した RNP リセプターの選択方法は、第二章に示した RNP リセプターの段階的高機能化法に適用でき、第二段階機能化に用いる RNA サブユニットの選択に効果を発揮する。Rev ペプチド N 末端近傍で基質と相互作用する RNA サブユニットと、ペプチドライブラリーを用いた RNP リセプターの段階的高機能化に興味をもたられる。

ランダム領域を構成する塩基数の異なる RNA ライブラリー (Nn RNA ライブラリー) を用いて、ATP 結合性 RNP リセプターを選択した結果、ランダム領域が 17 塩基から 34 塩基の RNA サブユニットが得られた。この結果より、Nn RNA ライブラリーは基質結合場の空間的な位置を多様化させるだけでなく、基質結合場を構成するための最小塩基数を探索することに利用

できると考えられる。そのため、RNP リセプターの構造解析が容易になり、今後は基質結合モジュールの探索をはじめとする機能性 RNP の構造と機能の関係を研究するための重要なツールとなり得る。

本章では、*in vitro* セレクション法により ATP に対して結合能を有する ATP 結合性 RNP リセプターを選択し、その後、基質結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターを選択した。結果に示した RNA サブユニットの塩基配列からも明らかのように、ATP 結合能のみで選択した RNP リセプターと、そこからペプチドサブユニットを利用し ATP 結合配向性を選択圧として選択された RNP リセプターの RNA サブユニットは、全く異なる塩基配列が収束した。この結果は、ある選択圧で収束したかに見えるライブラリーでも、そのライブラリー内には配列解析では発見できない高機能な RNP が存在している可能性があることを示している。また、複数の選択圧を順番にかけることによる RNP リセプターの機能化が可能であることを示している。これらの知見より、今後、*in vitro* セレクション法を用いた機能性 RNP の選択方法を改良することで、さらなる高機能な RNP を選択する方法論の開発が期待される。

結論

本章では、基質結合配向性を制御した RNP リセプターを構築する一般的な方法論の開発を目指し、特定の位置及び配向性で ATP と結合する ATP 結合性 RNP リセプターを選択する方法論を示した。まず、RNP リセプターの RNA サブユニットに、Rev ペプチドの N 末端に対して様々な位置で ATP 結合場を形成させるため、ランダム領域を構成する塩基数が異なる RNA ライブラリー (Nn RNA ライブラリー) を作製した。この Nn RNA ライブラリーを用いた *in vitro* セレクションにより、塩基長の異なる ATP 結合性 RNP リセプターを作製することに成功した。次に、ATP 結合配向性を制御した *in vitro* セレクションを行うため、Rev ペプチド N 末端にリン酸基を介して ATP を化学修飾した ATP-GRev ペプチドを作製した。この ATP-GRev ペプチドと、選択された RNA サブユニットの複合体を用いて、Rev ペプチド N 末端近傍において特定の配向で ATP と相互作用する ATP 結合性 RNP リセプターを選択する *in vitro* セレクションを行った。この方法で選択された RNP は、ATP 結合活性を有することを明らかにした。さらに、今回のセレクションで選択された RNA サブユニットと ATP-GRev の複合体は、アガロースに固定化された ATP に対する結合が阻害される結果を得た。この結果より、ATP 結合配向性を制御した *in vitro* セレクションにより選択された ATP 結合性 RNP リセプターは、ATP 結合場が Rev ペプチド N 末端近傍に存在していると示唆された。以上の結果より、基質修飾 Rev ペプチドサブユニットを用いて、基質結合配向性を制御した RNP リセプターを構築する方法論を示すことができた。

実験の部

試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸、HBTU (2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、HOBT (1-hydroxybenzotriazole) は渡辺化学工業から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂は Applied Biosystems 社から、ペプチド合成用 DMF、bromoacetic acid、DIC (diisopropylcarbodiimide) は和光純薬から購入した。7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid は Molecular Probes 社から購入した。ATP 固定化アガロース樹脂 (4% beaded アガロース固定)、ヌクレオチド (ATP、ATP γ S) は Sigma-Aldrich 社から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI)、T4 RNA リガーゼは New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。ライブラリー作成用 DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素 (AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase) は Promega 社から購入した。RNA 転写キット (Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit) は Epicentre 社から購入した。Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar は Difco 社より購入した。DNA ライブラリー、PCR プライマー用の DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。放射性アイソトープは Amersham Pharmacia 社から購入した。QIAprep Spin Mini Prep Kit は Qiagen 社から購入した。スピンカラム SUPREC-01 は TaKaRa 社から購入した。陽イオン交換樹脂 CM-TOYOPEARL 650M は TOSOH 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

ランダム領域の長さの異なる RNA ライブラリー (Nn RNA ライブラリー) の作製

3'末端がリン酸化された 40 塩基のランダムな塩基配列を含む鋳型 DNA (temp-Nn 40) に RRE 配列と 7 ランダムな塩基により構成されたランダムプライマー (Rev Nn7) を 99°C から室温まで 2 時間かけてアニーリングさせた後、Klenow DNA ポリメラーゼを用いて 25°C、15 分間の伸長反応により 2 本鎖 DNA を合成した。T7 プロモーターを含む FOR 01 プライマーと REV 01 プライマーを用いて、変性 94 °C、30 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分の条件により 4 サイクル PCR 反応を行うことで、異なる長さのランダム領域を含む 2 本鎖の DNA

ライブラリーを構築した。DNA ライブラリーを鋳型として Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit を用いて転写した RNA を長さの異なる Nn RNA ライブラリーとした。用いた DNA プライマーの配列を以下に示す。

temp-Nn 40 : 5'-GGAATAGGTCTGGGCGCA(N₄₀)-3'P (N はランダムな核酸塩基)

Rev Nn7 : 3'-NNNNNNNACTGCCATGTCCGGATAAGG-5'

Nn ライブラリーを用いた ATP 結合性 RNP リセプターの選択方法

Nn ライブラリーを用いた ATP 結合性 RNP リセプターは、以下の方法に従い選択した。結合反応には 4% beaded アガロース固定された ATP 樹脂を用いた。樹脂はあらかじめ、結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005% Tween20) により、樹脂容量の 3 倍量の結合バッファーで 3 回洗浄することにより平衡化した。50 µl 容量の ATP 樹脂、1 µM の Nn RNA ライブラリー、1.5 µM Rev ペプチド混合液 100 µl をスピнкаラム SUPREC-01 に加え、氷上で 30 分間、攪拌しながら結合させた。以下、第三章に示した RNP リセプターの選択方法に従った。

評価に用いる RNA の作製

選択された ATP 結合性 RNP リセプターの RNA 配列解析、クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析、配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製は第二章に示した方法に従った。

蛍光マイクロプレートリーダーを用いた蛍光強度測定

96 ウェルマイクロプレートリーダーを用いた蛍光測定は Wallac ARVOSx 1420 マルチプレートカウンター (Perkin Elmer 社) を用いて行った。0.5 µM 蛍光性 RNP を含む結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂) に、各濃度の ATP を加えた結合反応溶液 100 µl をマイクロタイタープレートに加え、数分穏やかに攪拌した後、30 分間インキュベートした。発光強度の測定は 7mC-Rev (355, 390 nm) のフィルターを用いて行った。

蛍光強度測定結果を基にした解離定数の算出

蛍光性 RNP と ATP との解離定数 K_D は、以下の理論式に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$F_{\text{obs}} = A \left(\frac{([FRNP]_T + [ATP]_T + K_D) - \sqrt{([FRNP]_T + [ATP]_T + K_D)^2 - 4[FRNP]_T [ATP]_T}}{2[FRNP]_T} \right)$$

A は結合が飽和する時の ATP 濃度における蛍光強度 ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) を示している。 K_D は解離定数、 $[FRNP]_T$ は蛍光性 RNP の濃度、 $[ATP]_T$ は ATP 濃度を示している。

ATP-Rev ペプチドの合成

リンカー分子として Rev ペプチドの N 末端に Gly 残基を導入した GRev ペプチドは、Simadzu PSSM-8 ペプチド合成機を用いて、Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.37 mmol/g) を 0.05 g 用いた。縮合は、樹脂に対して 10 当量の Fmoc アミノ酸、10 当量の HBTU、HOBT を 5% DIEA を含む DMF に溶解したものに加え、60 分攪拌することで行った。合成終了後の樹脂を DMF で 3 回洗浄後、bromoacetic acid (190 μmol) と DIC (190 μmol) を DMF に融解した溶液 1 ml を加え、室温下 3 時間反応させることによりプロモアセチル化を行った。ペプチドの樹脂からの切り出し及び脱保護は、氷上、窒素雰囲気下にてトリフルオロ酢酸 (5 ml)、チオアニソール (0.1 ml)、ジクロロメタン (1.5 ml)、水 (0.25 ml) の混合溶液を乾燥させた樹脂に加え、窒素雰囲気下、氷上にて 3 時間攪拌することにより行った。その後、ゲルろ過樹脂 G-10 (Amersham Pharmacia) を用いて粗精製を行い、逆相 HPLC (溶離液 A : 0.2% TFA/H₂O、溶離液 B : 0.2% TFA/50% CH₃CN/H₂O) により精製を行った。精製したペプチドは Voyager MALDI-TOF マススペクトル (Applied Biosystems) を用いて同定を行った。精製後のペプチドに対して 2 等量の ATP γ S を加え、10 mM TEAA (pH. 8.0) で pH を調整した反応溶液を室温下 3 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC (溶離液 A : 0.2% TFA/H₂O、溶離液 B : 0.2% TFA/50% CH₃CN/H₂O) により精製を行った。

ATP-Rev ペプチドを用いた ATP 結合配向性を制御した in vitro セレクション

ATP 結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターは、以下の方法に従い選択を行った。

結合実験には4% beaded アガロース固定された ATP 樹脂を用いた。結合反応は、ATP 樹脂に対しての12回選択を行った RNP ライブラリーの RNA サブユニット 5 μ M、5 μ M ATP-GRev ペプチドを含む結合バッファー溶液 (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005% Tween20) 100 μ l と樹脂容量 50 μ l の ATP 樹脂をスピнкаラム SUPREC-01 に加え、氷上で30分間結合反応を行った。結合反応後、遠心分離 (5,000 g、1分間、4 $^{\circ}$ C) を行い、樹脂に非結合の画分を回収した。さらに100 μ l の結合バッファーを加え攪拌した後、再び遠心分離により溶液を回収した。得られた非結合画分の溶液を樹脂容量 50 μ l の陽イオン交換樹脂 (CM-TOYOPEARL 650M (TOSOH)) に加え、氷上で30分間結合反応を行った。その後、遠心分離 (5,000 g、1分間、4 $^{\circ}$ C) により非結合画分を回収することで、RNA と複合体を形成していた ATP-Rev ペプチドを除いた。回収した溶液の RNA 濃度を UV 測定により定量し、等量の Rev ペプチドを加え、2回目の結合反応に用いるサンプル溶液とした。その溶液 200 μ l と樹脂容量 50 μ l の ATP 樹脂をスピнкаラム SUPREC-01 に加え、氷上で30分間結合反応を行った。遠心分離 (5,000 g、1分間、4 $^{\circ}$ C) により結合反応溶液を除き、さらに樹脂を200 μ l の結合バッファーで2回洗浄を行った。洗浄後の樹脂に4 mM ATP を含む結合バッファーを100 μ l 加え、氷上で10分間インキュベートし、結合した RNP を回収した。この溶出操作を2回行った。回収した RNA 精製、DNA への逆転写反応、RNA への転写反応は第三章の RNP リセプターの選択で示した方法に従った。転写した RNA は、次のサイクルの RNA ライブラリーとして用いた。

ATP-GRev ペプチドを用いた RNP リセプターの ATP 結合試験

樹脂量として20 μ l の ATP 固定化アガロース樹脂と、放射線ラベルした RNA (最終濃度 5 μ M) と各ペプチド (Rev および ATP-GRev ペプチド、最終濃度 5 μ M) を加えた結合バッファー (10 mM Tris-HCl (pH7.6)、10 mM KCl、10 mM MgCl₂) 50 μ l を、スピнкаラム SUPREC-01 に加え、氷上で30分間結合反応を行った。反応液を遠心分離 (5,000 g、1分間、4 $^{\circ}$ C) により濾過した後、300 μ l の結合バッファーを加え、遠心分離 (5000 g、1分間、4 $^{\circ}$ C) する操作を3回繰り返して樹脂を洗浄した。樹脂に結合した RNA は、4 mM ATP を含んだバッファー100 μ l で溶出させ、これを3回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用い

た RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%)、特異的結合画分(%)、非特異的結合画分(%)を算出した。

引用文献

- (1) Schultz, P. G.; Lerner, R. A. *Science* **1995**, *269*, 1835.
- (2) Prudent, J. R.; Uno, T.; Schultz, P. G. *Science* **1994**, *264*, 1924.
- (3) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- (4) Saran, D.; Frank, J.; Burke, D. H. *BMC Evol. Biol.* **2003**, *3*, 26.
- (5) Mannironi, C.; DiNardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *Biochemistry* **1997**, *36*, 9726.
- (6) Schneider, C.; Suhnel, J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 287.
- (7) Roychowdhury-Saha, M.; Lato, S. M.; Shank, E. D.; Burke, D. H.; *Biochemistry* **2002**, *41*, 2492.
- (8) Koizumi, M.; Breaker, R. R. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8983.
- (9) Famulok, M.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3990.
- (10) Burgstaller, P.; Kochoyan, M.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4769.
- (11) Schurer, H.; Stembera, K.; Knoll, D.; Mayer, G.; Blind, M.; Forster, H.; Famulok, M.; Welzel, P.; Hahna, U. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2557.
- (12) Wilson, C.; Nix, J.; Szostak, J. W.; *Biochemistry* **1998** *37*, 14410.
- (13) Ellington, A. D. *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 427.
- (14) Gold, L.; Polisky, B.; Uhlenbeck, O.; Yarus, M. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 763.
- (15) Jennifer F. Lee, J. F.; Hesselberth, J. R.; Meyers, L. A.; Ellington, A. D. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D95.
- (16) Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.
- (17) Hines, A. C.; Cole, P. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2951.
- (18) Parang, K.; Till, J. H.; Ablooglu, A. J.; Kohanski, R. A.; Hubbard S. R.; Cole, P. A. *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 37.

第五章

総括

これまでに、目的とする基質特異性と反応性を有する生体高分子を自在に設計、そして作製する試みが数多く行われている。その中で、従来のタンパク質工学的手法に加え、*in vitro* セレクション法や、ファージディスプレイ法の開発により、高機能を有する生体高分子を作製する技術が発展してきた。現在までに、抗体触媒や RNA 触媒が作製されてきたが、化学反応の遷移状態アナログ分子に結合する抗体もしくは RNA を作製するこれらの方法論では、天然の酵素に匹敵する触媒活性を生み出すことはできていない。天然の酵素活性に劣らないテラーメイド酵素を創製するためには、基質が厳密な配向性のもとに結合し、基質の基底状態、反応遷移状態および反応生成物に合わせて構造変化が可能な化学反応場を、生体高分子を用いて設計することが可能な方法論が必要である。森井らは、RNA とペプチドの複合体 (RNP) の RNA サブユニットに *in vitro* セレクション法を適用し、アデノシン三リン酸 (ATP) 結合性 RNP リセプターを作製した。本論文では、ATP 結合性 RNP リセプターの「RNA とペプチドの複数のサブユニットで構成されていること」こと及び「ペプチドサブユニットの機能化が可能であること」に着目し、ペプチドサブユニットの機能化による機能性 RNP 創製の方法論を開発した。

第二章では、RNP が複数のサブユニットから形成されているという利点を生かし、RNP を構成する RNA とペプチドサブユニットを段階的に機能化する方法論を開発した。ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットにループ構造を導入し、ループ構造を構成する 7 アミノ酸をファージディスプレイ法を用いてライブラリー化した。ライブラリー化したペプチドサブユニットと RNA サブユニットから得られる RNP リセプタープールから、新たに ATP 結合性 RNP リセプターを選び出した。その結果、もとの RNA サブユニットのみを機能化した ATP 結合性 RNP リセプターよりも高い ATP 親和性と ATP 選択性をもつ ATP 結合性 RNP リセプターが作製できることを明らかにした。これにより、複数の生体高分子サブユニットを用いて、高い分子識別能と親和性を持つリセプターが作製できることを実証した。本論文で示した RNP リセプターの段階的高機能化法は、基質に対する親和性、選択性を多段階的に制御することが可能であることから、RNP リセプターに基質の基底状態、遷移状態および反応生成物に合わせて最適化

された化学反応場の構築が可能であると考えられる。即ち、化学反応の進行に応じて反応場の構造が変化することで触媒活性を発揮させるという、新たなテーラーメイド酵素の作製法の開発が期待できる。

第三章では、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに蛍光分子を導入することで、リセプターとしての性能を維持しつつ、ATP との結合に伴い蛍光強度が変化する ATP 応答性蛍光 RNP センサーに機能改変できることを明らかにした。これにより、RNP の各サブユニットに異なる機能を付加することによって、新たな機能性生体高分子の作製が可能であることを明らかにした。種々の蛍光分子で修飾した蛍光性ペプチドサブユニットライブラリーを用いることにより、望みとする励起・発光波長で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを簡便に得る方法論を開発した。また、*in vitro* セレクション法により得られた各 RNP リセプターが、ATP に対する親和性が多様であることを利用し、幅広い濃度レンジで応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーの作製を可能にした。さらに、ATP 応答性蛍光 RNP センサーの作製と同様の方法で、GTP 応答性蛍光 RNP センサーを作製した。本方法論は、リセプター自身を蛍光センサーに機能改変する従来のセンサー作製法の問題点を克服し、RNP リセプターの基質との結合に関わる RNA サブユニットを化学修飾することなく、任意の標的に対するテーラーメイド蛍光センサーを作製する一般的な方法論となることが期待される。

第四章では、基質の結合配向性を制御した RNP リセプターの作製方法を開発した。ペプチドサブユニットのアミノ末端に ATP を固定化した ATP-GR_{ev} ペプチドを用いてセレクションを行う方法論を開発し、基質 ATP の結合配向性を制御した ATP 結合性 RNP リセプターを得ることに成功した。本方法論の開発により、天然の酵素にみられる厳密な結合配向性のもと基質が結合する化学結合場を RNP リセプターに設計することを可能にする。また、本方法論はペプチドサブユニットに触媒活性基を導入し、合目的な分子設計によりテーラーメイド酵素を作製するための基盤的方法論となる。

本論文で開発した RNP リセプターの段階的高機能化法および基質結合配向性を制御した RNP リセプター作製法により、天然の酵素に見られる「化学反応の進行に伴う構造変化」と「厳密な配向性のもと基質が結合する」という特徴の設計が可能となり、天然の酵素に引けをとらない触媒活性を有したテーラーメイド RNP 酵素の作製が期待できる。本論文で新たに開発した、迅

速かつ簡便に望みとする性質を有した蛍光RNPセンサーを作製する方法論を応用することにより、環境中に存在する数多くの環境汚染分子をそれぞれ高感度に検出できる計測ツールの開発が可能である。また、蛍光性RNPセンサーは、共有結合によって複合体を安定化させることにより、マイクロチップ上に固定化することが可能である。様々な環境汚染分子を同時に、かつ簡便に計測することが可能な蛍光性マイクロアレイセンサーは、持続可能社会の実現に必要な新しい環境計測技術となることが期待できる。現在までにRNA、タンパク質をそれぞれ単独で用いた機能性生体高分子を創製する方法論が示されてきたが、本論文では、RNPリセプターを機能化する方法論の開発により、RNA-タンパク質複合体を用いた機能性分子創製という新しい分野を開拓した。今後、本論文に示した方法論を発展させることにより、高機能なRNA-タンパク質もしくはRNA-ペプチド複合体の創製が期待される。

論文目録

第二章

(主論文)

Stepwise Molding of a Highly Selective Ribonucleotide Receptor

(リボヌクレオペプチドリセプターの段階的高機能化)

Shin-ichi Sato, Masatora Fukuda, Masaki Hagihara, Yukiko Tanabe, Katsutoshi Ohkubo,
and Takashi Morii

2005年1月12日発行

Journal of the American Chemical Society 第127巻 1号 30頁～31頁

(参考論文)

Optimization of an ATP-binding ribonucleotide receptor

(ATP結合性リボヌクレオペプチドリセプターの最適化)

Shin-ichi Sato, Tetsuya Hasegawa, Masaki Hagihara, Masatora Fukuda, Katsutoshi Ohkubo,
and Takashi Morii

2003年9月発行

Nucleic Acids Research Supplement 第3巻 239頁～240頁

(関連する原著論文、総説など)

ファージディスプレイ法を用いたセレクション ～標的分子に結合する生体分子の作製～

福田将虎、杉本健二、森井 孝

2006年10月発行

生命科学研究所レター 22号 24頁～29頁

第三章

(主論文)

A Modular Strategy for Tailoring Fluorescent Biosensors from Ribonucleopeptide Complexes

(リボヌクレオペプチド複合体を用いた蛍光性バイオセンサーの構築)

Masaki Hagihara, Masatora Fukuda, Tetsuya Hasegawa, and Takashi Morii

2006年10月4日発行

Journal of the American Chemical Society 第128巻 39号 12932頁～12940頁

(参考論文)

Stepwise functionalization of ribonucleopeptide complexes to receptors and sensors

(リボヌクレオペプチド複合体の段階的高機能化)

Masatora Fukuda, Yukiko Tanabe and, Takashi Morii

2005年9月発行 *Nucleic Acids Research Supplement* 第49号 355項～356項

第四章

(主論文)

Construction of an ribonucleopeptide receptor regulated binding geometry

(基質結合配向性を制御した RNP リセプターの構築)

Masatora Fukuda, Masaki Hagihara and Takashi Morii

投稿準備中

学会発表

第7回生命化学研究会シンポジウム（仙台 2005年1月）

リボヌクレオペプチドレセプターの段階的構築法

福田将虎、佐藤慎一、萩原正規、大久保捷敏、森井 孝

日本化学会第85春季年会（神奈川 2005年3月）

RNA - ペプチド複合体の段階的高機能化

福田将虎、佐藤慎一、萩原正規、大久保捷敏、森井 孝

国際核酸化学シンポジウム（福岡 2005年9月）

Stepwise functionalization of ribonucleopeptide complexes to receptors and sensors

Masatora Fukuda, Yukiko Tanabe and Takashi Morii

SORST ジョイントシンポジウム（大阪 2005年11月）

リボヌクレオペプチドリセプターを用いたテララーメイドバイオセンサーの開発

福田将虎・森井 孝

Gordon Research Conference Bioorganic Chemistry（ニューハンプシャー 2005年6月）

Stepwise Molding of Functional Ribonucleopeptide complexes

Masatora Fukuda, Takashi Morii

環太平洋国際化学会議（ハワイ 2005年12月）

Ribonucleopeptide receptor recognizing partial structure by each subunit

Masatora Fukuda and Takashi Morii

日本化学会第 86 春季年会 (横浜 2006 年 3 月)

RNA-ペプチド複合体の段階的高機能化

福田将虎・森井 孝

バイオ関連化学合同シンポジウム (京都 2006 年 9 月)

ペプチドライブラリーを用いたリボヌクレオペプチドリセプターの段階的高機能化

福田将虎・森井 孝

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学エネルギー理工学研究所 森井 孝教授に謹んで感謝の意を表します。

常に誠意ある御指導を賜りました大久保 捷敏京都大学名誉教授に心より感謝いたします。

本博士論文を作成するにあたり、多くの御助言御指導賜りました牧野 圭祐博士（京都大学エネルギー理工学研究所教授）、木下 正弘（京都大学国際融合創造センター教授）に感謝いたします。種々の有益な御助言並びに御激励いただきました佐川 尚博士（京都大学エネルギー理工学研究所助教授）に感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、海外での貴重な経験ならびに多くの御助言御指導賜りました Christine Chow 博士（Wayne State University 教授）に心から感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、多くの御助言御指導賜りました上杉 志成博士（京都大学化学研究科教授）に感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、実験構想および実験手法の細部に至るまで熱心な御指導御助言賜りました、萩原 正規博士（大阪大学産業科学研究所助手）、佐藤 慎一博士（Baylor College of Medicine 研究員）、杉本 健二博士（京都大学エネルギー理工学研究所助手）に心から感謝いたします。研究を行うにあたり、多くの御助言御指導賜りました藤井 康代博士（京都学園大学助教授）、秦 恵博士（Universities Space Research Association 研究員）に心から感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、熱心な討論を戴きました、長谷川 哲也氏（京都大学生存基盤科学研究ユニット研究員）、平田 晃義氏（株式会社ハイペップ研究所）に感謝いたします。本論文を作成するにあたり、多くの御助言いただきました藤枝 伸宇博士（次世代開拓研究ユニット助手）に感謝いたします。研究を行うにあたり、様々な御助言、御協力いただきました、坂口 玲子女史、井上 雅文氏、林 宏典氏、松村 貴弘氏、藤本 菜保女史、仲野 瞬氏に心から感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、様々な御配慮、御助言いただきました木村 のり子女史、森井 靖子女史に深く感謝いたします。様々な局面で支援していただいた、生物機能科学分野の方々、機能性先進材料分野の方々に深く感謝いたします。研究生活を送るにあたり、心の支えとなってくれた竹本 沙織さんに心から感謝いたします。

最後に、様々な面で心の支えとなってくれた家族や友人に心から感謝いたします。