

氏名	ふく だ まさ とら 福 田 将 虎
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 148 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻
学位論文題目	RNA-ペプチド複合体を用いた機能性分子の創製

論文調査委員 (主査) 教授 森井 孝 教授 木下正弘 教授 牧野圭祐

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、環境適合性の高い生体高分子を用いた機能性分子創製法の確立を目指して、アデノシン三リン酸 (ATP) を高選択的に捕捉する、ペプチドとリボ核酸 (RNA) の複合体 (RNP) をもとにした RNP リセプターの開発と、RNP リセプターを用いて ATP を迅速かつ高感度で光学的に検出する蛍光センサーの開発を論じた結果をまとめたもので、6章からなっている。

第1章は序論であり、研究の背景をまとめている。現在までに、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が、生体内に数多くの RNA-ペプチド複合体 (RNP) が存在するにもかかわらず、RNP を用いた機能性生体高分子を作製する試みは、ほとんど報告されていない。生体高分子を用いて人工的に機能性分子を開発することの重要性、生体内で重要な役割を果たしている RNA-タンパク質複合体の構造と機能、そして、タンパク質もしくは RNA を用いてこれまでに開発されたりセプターおよびバイオセンサーの作製法について、化学的な見地から記述されている。

第2章では、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て RNP リセプターを作製する方法論を発展させるため、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに新たにループ構造を導入した。ファージディスプレイ法を用いて、ループ構造を構成する 7 アミノ酸をランダムなアミノ酸配列としたペプチドライブラリーを作製した。ペプチドライブラリーと RNA サブユニットから得られる RNP リセプターライブラリーから、セレクション法を用いて新たに ATP 結合性 RNP リセプターを得た。その結果、もとの RNA サブユニットのみに *in vitro* セレクション法を適用して作製した 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 リセプターを得ることに成功した。これにより、RNP 複合体の RNA サブユニット及びペプチドサブユニットを順次ライブラリー化し、目的とする機能を持つようにセレクションを行うことで、段階的に RNP リセプターを高機能化する方法論を開発した。

第3章では、ATP 結合性 RNP リセプターを構成するペプチドサブユニットの N 末端を蛍光分子で化学修飾した蛍光性ペプチドを合成し、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 センサーを作製することに成功した。従来の生体高分子リセプターを利用したセンサー作製法では、生体高分子リセプターの基質結合部位周辺を蛍光分子で化学修飾するため、リセプター本来の結合活性や安定性を失う問題点があった。本方法論では、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しないため、RNP リセプターの結合活性を保ったまま蛍光 RNP センサーが作製できる。さらに、励起・発光波長の異なる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と RNA サブユニットライブラリーを組み合わせることで ATP 応答性蛍光 RNP ライブラリーを作製し、ハイスループットセレクションにより、目的とする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、ATP 滴定によるスクリーニングにより、幅広い濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサー

を簡便に得られることを示した。これらの手法を応用することにより、グアノシン三リン酸（GTP）に対して、様々な発光特性、望みとする励起・発光波長、幅広い濃度領域で応答する GTP 応答性蛍光 RNP センサーが作製できたことから、本方法論はテラーメイド蛍光センサーを作製する方法となることが期待できる。

第4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-GRev ペプチドを用いて *in vitro* セレクション法を行う方法論を開発し、基質 ATP のリセプターへ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に基質が結合する結合場を RNP リセプターを用いて設計することが可能になる。また、本方法論は、合目的な分子設計により、RNP リセプターのペプチドサブユニットに触媒活性基を導入してテラーメイド酵素を作製するための基盤的方法論となる。

第5章は本博士論文を総括するものであり、RNP が複数のサブユニットから形成される構造的利点を生かし、RNP の RNA サブユニットとペプチド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分野を開拓した成果がまとめられている。また、本論文で開発した RNA とペプチド複合体をもとにした機能性分子構築法の有用性と、テラーメイド酵素作製技術への応用が論じられている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、RNA-ペプチド複合体（RNP）を用いて構築されたアデノシン三リン酸（ATP）結合性リセプターに注目し、RNP が複数のサブユニットから形成されている利点を生かすことによって、親和性と選択性の高い ATP 結合性リセプターを作製する方法論、および ATP 結合性リセプターを蛍光性 ATP センサーへと機能変換する方法論について研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

まず、ATP 結合性 RNP リセプターのペプチドサブユニットに7アミノ酸からなるループ構造を導入し、ファージディスプレイ法を用いて RNP ライブラリーを構築する方法論を開発した。この方法を用いて、段階的に RNP リセプターの RNA サブユニットとペプチドサブユニットを機能化し、高い ATP 親和性・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。次に、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-Rev ペプチドを用いて *in vitro* セレクションを行う方法論を新たに開発し、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ている。

また、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機能を維持しつつ、ATP との結合に伴って蛍光強度が変化する ATP 応答性蛍光 RNP センサーが作製できることを明らかにした。さらに、励起・発光波長の異なる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 センサーと幅広い濃度領域で応答する ATP 応答性蛍光 RNP センサーを得ることに成功した。この蛍光 RNP センサー作製法は、従来の蛍光センサー作製法の問題点を克服し、任意の基質に対するテラーメイド蛍光センサーの作製を可能にする方法論である。

本研究は、複数のサブユニットから形成される RNA-ペプチド複合体の構造的利点を生かし、複合体を構成する RNA サブユニットとペプチドサブユニットに異なる機能を付加する方法論を開発することによって、新たな機能性生体高分子を構築する科学分野の開拓に大きな貢献を行ったと評価する。

よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年1月25日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。