

(続紙 1)

京都大学	博士（エネルギー科学）	氏名	仲 野 瞬
論文題目	The structural and the functional aspects of ribonucleopeptide receptors and sensors （構造情報をもとにしたリボヌクレオペプチドリセプターおよびセンサーの機能発現機構の解明）		
(論文内容の要旨)			
本論文は、RNA-ペプチド複合体（RNP）を用いた機能性分子設計に着目し、アデノシン三リン酸（ATP）に選択的に結合するRNPリセプターおよびRNPセンサーの作製、RNPリセプターの構造解析によるATP認識機構の解明、そしてRNPの構造と分子認識機構をもとにした機能性RNP設計法を論じた結果をまとめたものであり、全9章からなっている。 第1章は序論であり、生物の優れたエネルギー利用システムを担う酵素に比べて、これまでに報告された人工酵素の活性が著しく低い理由を論じ、その問題を解決するためには、立体構造と分子認識機構にもとづく合目的なRNPの分子設計とライブラリー法の効果的な応用が有効であると結論づけている。 第2章では、RNPを基本骨格とするライブラリーにin vitroセレクション法を適用してATP結合性RNPリセプターを作製した。得られるRNPリセプターのATP親和性と分子認識能は、in vitroセレクションで用いた樹脂への基質ATP固定化様式に著しく影響を受けることを明らかにした。RNPの塩基配列とATP類縁体に対する親和性評価から、本研究で得られたRNPは過去に報告されたATPアプタマーとは異なる基質結合様式をもつことが示唆された。 第3章では、NMR測定によりRNPとATPとの複合体構造を解析し、ATP結合様式ならびに複合体三次元構造の解明を目指した。構造解析の結果、RNPはU:A:Uトリプルを形成してATPと結合し、過去に報告されたATPアプタマーとは全く異なるATP結合様式および構造をもつことが明らかになった。 第4章では、RNA分解酵素、ジメチル硫酸(DMS)による化学修飾およびインラインプロービングを用いた構造解析によりRNPとATPとの複合体の二次構造を解析し、ATP結合領域を形成する塩基を特定した。 第5章では、RNPリセプターの変異体を作製し、それらのATPとの親和性を評価することにより、U:A:Uトリプル形成により直接ATPに結合するU塩基と、RNP分子内でHoogsteen型A:U塩基対を形成するU塩基を特定した。この情報をもとにU:A:UトリプルをC⁺:G:Cトリプルへと変異させることにより、ATPリセプターをGTPリセプターへと機能変換することに成功した。 第6章では、ATP結合性RNPリセプターの構造情報をもとにしてRNPセンサーの蛍光応答性と構造との相関を検討した。ATP結合に伴うRNPリセプターの構造変化が蛍光強度変化を誘起することを明らかにした。 第7章では、蛍光分子を導入したRevペプチドとRRE RNAとの複合体をモジュールとして用いる、構造をもとにしたセンサー設計法を開発し、GTP結合性RNAアプタマーを蛍光センサーに機能改変できる実例を示した。			

第8章では、構造をもとにした分子設計によりRNPを構成するRNAとペプチドを共有結合により融合した。これにより低濃度でRNPセンサーを使用することが可能になっただけでなく、細胞抽出液中でのRNPの安定性も向上した。共有結合により融合したRNPセンサーを2種類作製し、ATPとGTPを異なる検出波長で同時測定する具体的な使用例を示した。

第9章では、高温でも安定に機能するATP結合性RNAを作製するためのin vitroセレクション法を開発した。

最終章は本論文の総括である。本論文は、RNPの構造解析を初めて行い、分子認識能および蛍光応答性とRNP構造との相関性を明らかにすることにより、構造情報をもとにした合理的な機能性分子作製の実例を示した。また、in vitroセレクション法における基質の固定化様式が、得られるRNPの機能と構造に著しく影響を与えることを明らかにし、標的化合物に特異的に結合するRNPを作製するための新しい指標を示した。これらの成果は、今後RNPを用いてリセプター、センサー、酵素などの機能性分子を合理的に作製する方法論を確立するための基礎的な知見として重要であり、新たなエネルギー利用、物質変換系を担う生体高分子の開発に大きく貢献するものである。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、RNA-ペプチド複合体（RNP）を用いたアデノシン三リン酸（ATP）に選択的に結合するRNPリセプターおよびRNPセンサーの作製、RNPリセプターの構造解析によるATP認識機構の解明、そしてRNPの構造と分子認識機構にもとづく機能性RNP設計法の開発について研究した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. RNPリセプターとATPとの複合体構造をNMR測定により解析し、RNPがU:A:Uトリプルを形成してATPと結合する新しい分子認識様式を明らかにした。

2. RNPとATPとの複合体の二次構造を化学修飾・限定酵素分解により解析し、ATP結合領域を形成する塩基を特定した。さらに、RNP変異体のATP結合を評価し、U:A:Uトリプル形成により直接ATPに結合するU塩基と、RNP中で形成される分子内Hoogsteen型A:U塩基対を特定した。

3. RNPとATPとの分子認識様式をもとにして、U:A:UトリプルをC⁺:G:Cトリプルへと変異させ、ATP結合性RNPをGTP結合性RNPへと機能改変することに成功した。

4. RNAアプタマーに蛍光性RNPを融合するモジュール設計法を開発し、蛍光センサーを構築する一般的方法としての実例を示した。

5. RNPの構造をもとにした分子設計によりRNAとペプチドを共有結合で融合したRNPセンサーは、低濃度で機能を発揮するだけでなく細胞抽出液中での安定性も向上した。2種類のRNPセンサーによりATPとGTPを同時に異なる波長で検出する実例を示した。

以上、本研究では、ATP結合性RNPリセプターの構造とそのATP認識機構を初めて明らかにするとともに、構造情報をもとにした合理的な機能性分子設計の実例を示した。これらの成果は、今後RNPを用いてセンサー、酵素などの機能性分子を合理的に作製する方法論を確立するための基礎的な知見として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23年6月22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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降