

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

平成30年 4月 26日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所 属 部 局 エネルギー理工学研究所

職 名 助 教

氏 名 仲 野 瞬

助 成 の 種 類	<b>平成29年度 ・ 研究活動推進助成</b>			
申請時の科研費 研究 課 題 名	生成物解離を促進する設計による回転数に優れた人工RNA-ペプチド 複合体酵素の作製			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	蛍光分子ライブラリーを用いたRNA-ペプチド複合体センサーの作製			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 文献: S. Nakano, T. Tamura, R. K. Das, E. Nakata, Y.-T. Chang, T. Morii ChemBioChem 2017, 18, 2212-2216., 学会発表(口頭): 第11回バイオ関連化学シンポジウム 2017.9.7, 学会発表(ポスター): The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017 / The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry 2017.11.15			
成 果 の 概 要	<b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	731,034	
		学会参加費	61,080	
旅費		207,886		
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 科研費の取得ができず、研究の進行が難しいなかで本助成を頂けたことは大いに助けになりました。使途の自由度も高く、今後の研究に関する基礎的な部分の検討を進めることができました。感謝申し上げます。			

## 成果の概要／仲野 瞬

我々はこれまでに、RNA-ペプチド複合体(RNP)を構造基盤に用いた機能性生体高分子の作製方法論の開発をおこなってきた(T. Morii *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617-4622. など)。三次元構造が既に明らかな RNP の RNA サブユニットにランダムな塩基配列を導入して作製した「RNP ライブラリー」の中から、標的の小分子に特異的に結合する「RNP リセプター」を *in vitro* セレクションにより選択できる。ライブラリー法を適用することによって、標的基質に対して様々な親和性をもった「RNP リセプターライブラリー」を一度に獲得することができる。

さらに、作製したこれらの RNP リセプターのペプチドサブユニットを機能化することで、リセプターの基質結合性は維持したまま、さらなる機能変換をおこなうことができる。これまでに、ペプチドサブユニットにランダムペプチド配列を導入したライブラリーを用いてセレクションをおこなうことにより、基質結合場を拡張して、リセプターの基質識別能を改善した RNP リセプターを作製することに成功した(S. Sato *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 30-31.)。また、ペプチドサブユニットに蛍光分子を導入することで、基質結合に伴って蛍光強度が変化する「蛍光性 RNP センサー」(M. Hagihara *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12932-12940. など) や、触媒分子を導入して近接効果により標的反応の加速を示す「RNP 触媒」の作製に成功した(T. Tamura *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1881-1888.)。このように、複合体を基本骨格に用いて各サブユニットを段階的に機能化することで、RNA サブユニットとペプチドサブユニットの組み合わせによる簡便かつ合目的なライブラリーの多様性の拡大が可能である。そして、スクリーニングにより、親和性や蛍光応答性などの、目的の機能を指標とした RNP の選出をおこなうことができる。また、本方法では、RNA サブユニットがもつ基質親和性や特異性を維持したままでのリセプターベースの機能性分子作製を容易におこなうことができる。

この RNP の段階的機能化による、蛍光性 RNP センサーや RNP 触媒の作製における改善点の一つとして、望みの基質親和性や基質特異性、立体構造などをもつ「ある特定の RNP リセプター」に着目して機能化をおこなう際には、そのリセプターが必ずしも顕著な蛍光応答性や触媒活性を発揮するとは限らないことが挙げられる。これは、既定のリセプターの基質結合性を生かした分子設計をおこないたい場合には、大きな制約となる。そこで本助成研究では、注目したある特定の RNP リセプターを利用して機能分子を作製するための、新たな「RNP ライブラリー作製法」の開発を目指した。これには、多様な合成ペプチドライブラリーを簡便に調製し、特定の RNP リセプターと組み合わせたライブラリーを構築する方法の確立が必要である。

本研究では、蛍光性 RNP センサーの作製を事例とした。合成した「蛍光分子ライブラリー」を「蛍光分子修飾ペプチドサブユニットライブラリー」へと変換し、ある特定の RNA サブユニットと複合体形成させることで、多様な「蛍光分子修飾 RNP リセプターライブラ

リー」を作製し、その中から蛍光応答性を指標とした分子選択をおこなうことを目指した。

異なる励起・蛍光波長をもった4種の基本骨格をもつ、263個の蛍光分子のライブラリーを利用した。これらの蛍光分子は全てクロロアセチル基を有しており、それをヨードアセチル基へと変換したのちに、ペプチドサブユニットのN末端に導入したシステイン残基のチオール基と反応させることで、「蛍光分子修飾ペプチドサブユニットライブラリー」を合成した。エーテル抽出による粗精製をおこなったのち、特定のATP結合性RNPリセプターのRNAサブユニット(An16)とそれぞれのペプチドサブユニットを複合体形成させて、一度に多数の蛍光分子修飾RNPリセプターの蛍光応答性の評価をおこなった。基質の存在下と非存在下で1.3倍以上の蛍光強度変化が見られたRNPを選出した。選出した各蛍光分子修飾ペプチドをHPLCにより精製し、再度蛍光強度変化比を評価した結果、13のRNP候補のうち、9つについて、スクリーニング時と同様、またはそれ以上の蛍光強度変化を示すRNPセンサーであることが示された。このうち、蛍光分子CXCA1を用いて作製したRNPセンサー(An16/CXCA1-Rev)の基質結合能を評価した結果、もともとのリセプターと比較して若干の親和性の低下が認められるものの、実際に基質ATPに対して結合していることが示された。(S. Nakano, T. Morii *et al.* *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2212-2216.)

以上の結果から、多数の化合物ライブラリーをRNPのペプチドサブユニットに導入して、機能性を指標としたスクリーニングを行うことによって、ある着目した性能を持つ特定のRNPリセプターを基にして機能性分子を作製する新しい方法を開発することに成功した。

本方法論の応用により、合成触媒分子のライブラリーと、「生成物との親和性制御を行った基質結合性RNPリセプター」とを利用することにより、生成物の解離速度を改善した人工RNP酵素の作製法開発への展開が期待できる。