

論文の要約

報告番号	甲 第 1030号	氏名	熊地 重文
学位論文題目	In vitro selection of novel functional peptides related with the RNAs (RNAと相互作用する新規機能ペプチドの試験管内淘汰に関する研究)		
<p>論文の要約</p> <p>RNA-タンパク質相互作用は転写、翻訳の調節など生命現象の根幹を成しており、特に non-coding RNA(ncRNA)は細胞内においてRNA単体で存在することはほとんどなく、タンパク質と複合体を形成することにより機能していることがわかっている。一方、生命の起源研究では地球上の最初の生命分子はRNAであるといういわゆるRNAワールド仮説が有力な仮説となっている。そこにタンパク質が出現しRNAと相互作用して共進化することでRNPワールドへと移行したのではないかという仮説も提案されている。このようにRNA-タンパク質相互作用の研究は現在の生命活動の根幹をなすため生命の起源初期でのRNAに対するペプチドの進化可能性を実験的に明らかにする。</p> <p>RNAと相互作用する新規機能ペプチドの創出には進化工学的技術であるcDNA display法による分子進化システムを用いたが、まずこの効率化を目指した。従来cDNA display法では取得した配列の機能評価に時間とコストがかかった。本研究ではピューロマイシン・リンカー技術と無細胞翻訳技術を組み合わせた蛍光相関分光法(FCS)を用いた迅速かつ簡便な相互作用解析法を開発した。これにより、従来1か月ほどかかる時間が1~2日で可能となった。また、FCSによりライブラリ全体の相互作用解析を行うことで淘汰の進行度を測定することにも成功した。これらにより、cDNA display法による分子進化システムの効率化が達成されたといえる。</p> <p>以上の成果を踏まえ、実際にRNAと相互作用する新規機能ペプチドの創出を試みた。まずは、最も原始的なモデルとしてGly、Ala、Asp、Valの4種類の30アミノ酸からなるペプチドライブラリからtRNAと結合するペプチドの創出を試みた。淘汰されたペプチドを解析した結果、側鎖に正の電荷を持たない4種類のアミノ酸からなるペプチドにもかかわらず弱いながらもtRNAと結合できるものが取得された($K_D^{app}=66\pm3 \mu\text{M}$)。また、プルダウン・アッセイによりの塩基が露出しているYYR(Y=ピリミジン、R=プリン)の配列に特異的に結合することが示唆された。このことから結合部位はtRNA3'末端にあるCCAの共通配列であると推察された。</p> <p>続いて、Gly、Ala、Asp、Val、Ile、Thr、Asn、Serの8種類の30アミノ酸からなるペプチドについて、リボザイムの活性を向上させるペプチドの試験管内進化を試みた。RNAワールド仮説にタンパク質が出現しRNAの機能を高めることが出来れば、RNAとタンパク質は共進化して現在の翻訳系となりえることが示唆されている。そこで、実際にRNA伸長リボザイムの活性を高めるペプチドの取得を試みた。その結果、1.8倍程度活性を高めるペプチドを取得することに成功した。</p> <p>これらの結果よりアミノ酸の種類を制限した原始的モデルタンパク質においてもRNAと相互作用し、さらにRNAの触媒活性を高めうることが示された。現在RNAワールドにタンパク質が出現しRNPワールドへと移行したという考えは広く受け入れられている。しかし、この移行に関する実験的研究はほとんど行われていない。本研究はRNPワールドへと移行に関するRNA-原始タンパク質の相互作用に関する世界でも最初の実験的成果であり、原始タンパク質の役割についての新しい知見をもたらすものである。</p>			