



Title	RNA自己複製反応を高感度に検出可能なレポーターシステムの開発に関する研究
Author(s)	西山, 浩太郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52019
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (西山浩太郎)	
論文題名	RNA自己複製反応を高感度に検出可能なレポーターシステムの開発に関する研究
論文内容の要旨	
<p>レポータータンパク質は、基質分解反応を起こすことで検出感を大きく向上させるため、遺伝子・抗体・タンパク質などと結合させ、タンパク質相互作用や細胞内分布の検出、スクリーニングに用いられている。中でも、βガラクトシダーゼ (bGal) は安定性と反応性の高さから広く利用され、多種の基質が開発されている。さらに、bGalではN末端側を欠損し不活性化したωタンパク質を入れておけば、欠損部分を補うαタンパク質だけでレポーターとして働くこと (α-コンプリメンテーション) が知られている。αタンパク質の特徴として、上記の反応により高い基質分解活性を示すために検出感度が高く、しかも非常に小さい (45から200アミノ酸) ために反応を阻害しにくいことが挙げられる。</p> <p>本研究では、まずこのαタンパクを用いたレポーターシステムを我々の研究室で構築したRNA自己複製反応系に応用し、リアルタイムで反応を検出することを試みた。RNA複製反応は生命システムの中で非常に重要な反応であり、リアルタイムに反応を追跡できれば、RNA複製反応の理解へ貢献することが期待できる。以前の研究では、bGalを蛍光レポーターとして用いたが、反応効率が1400分の1と非常に低いことが分かった。そこで蛍光レポーターとしてbGalのα-コンプリメンテーションを用いた。bGalの代わりにαタンパク質をコードしたことで、鋳型RNAの長さが短く (約5400塩基から約2500塩基) なり、蛍光で検出可能という特性を保持したまま反応効率が向上した反応系を構築することができた。</p> <p>上記の自己複製反応に用いたαタンパク質は、α-コンプリメンテーション活性が低く微小区画内での観察には検出感度が低いという問題点があった。そこで、次にαタンパク質の改良により、検出感を向上することを目指した。先行研究より、大腸菌内・動物細胞内など環境の違いにより最適なαタンパク質の大きさが違うことが報告されている。そこで、まず無細胞翻訳系においてαタンパク質として用いるbGal領域の最適な大きさを探索した。その結果、領域の大きさを180塩基にすることにより、活性を5倍に上げることができた。さらに、微小区画内実験室進化による改良を行った。その結果、77番目のアミノ酸が変わったことで、リボソーム内で180塩基長のαタンパク質よりも4倍活性が高い、リボソーム内反応に特化したαタンパク質が得られた。また、αタンパク質の最小サイズを探索したところ、15アミノ酸という非常に小さいタンパク質でα-コンプリメンテーション活性を持つことが分かった。本研究で開発した改良型αタンパク質は、αタンパクがレポーターとして使われている様々な研究における検出感度の向上に貢献するだろう。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (西 山 浩 太 郎)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 四方 哲也
	副 査	教 授 松田 秀雄
	副 査	教 授 清水 浩
	副 査	教 授 若宮 直紀
	副 査	教 授 前田 太郎
論文審査の結果の要旨		
<p>再構築反応系は、細胞のように外部から栄養を取り込むことが難しいため、使用可能な資源に限られた環境下で反応を行わなくてはならない。そのため、レポータータンパク質を発現するために資源を大量に必要としては、目的の反応の進行を阻害することになる。そのため、反応を阻害しない小さいレポータータンパクの開発が求められている。本研究で用いる、βガラクトシダーゼのα-complementation は、αタンパク質という小さいタンパク質(50~200アミノ酸)によって基質分解反応が開始するため、再構築反応系のレポーターとして適している。しかし、これまでに再構築反応系でα-complementationが使用された前例がなかった。</p> <p>そこで本論文では、再構築反応系にα-complementationを組み込むことで有用性を示すこと、再構築反応系のレポーターに特化する改良をすることを目的としている。2章では、再構築反応系でのα-complementation利用の一例として、RNA自己複製反応系のレポーターシステムに応用した。その結果、試験管内・リボソーム内の両方で、βガラクトシダーゼを用いた場合よりも検出感度を向上させることができた。α-complementationは再構築反応系でもレポーターとして機能し、反応効率への影響が小さくなることを示している。α-complementationの活性が低いことから、3章ではαタンパク質の配列の改良を行うことでα-complementationの活性の10倍以上の向上を目指した。その結果、試験管内で1.4倍、リボソーム内では4倍の活性を示すαタンパク質の配列を獲得しており、リボソーム内反応に特化している。4章では、PURE system中での最適な配列を探索し、27アミノ酸という非常に小さなαタンパク質でもα-complementation活性を持っていることが確認できている。α-complementationは、ωタンパク質の欠損部分をαタンパク質が補填することで基質分解活性を獲得する反応である。しかし、この25アミノ酸のαタンパク質は、ωタンパク質の欠損部分の全てを補填していないにも関わらず、α-complementation活性を示した。そこで、PURE system中で検出可能な最小のαタンパク質の探索を行った。本研究では、最小で25アミノ酸のαタンパク質でα-complementation活性が確認できた。このことから、α-complementationではαタンパク質がωタンパク質の欠損部分を全て補填しなくても良いという新しい知見を得ることができた。</p> <p>本研究成果は、再構成系の翻訳反応をできるだけ阻害しないレポーターを開発した点において重要な成果である。また、α-complementationはまだ反応機構が完全に解明されていないため、本研究で見出したサイズの効果はα-complementationの理解にとっても貢献すると考えられる。したがって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として価値あるものと認める。</p>		