

氏名	はせがわ てつ や 長谷川 哲也
学位(専攻分野)	博士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 149 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	シグナル分子に応答する RNA-ペプチド複合体の創製

論文調査委員 (主査) 教授 森井 孝 教授 吉川 暹 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利用したバイオセンサー構築法の確立を目的として、RNA-ペプチド複合体を用いた生体内シグナル伝達分子を高選択的に捕捉するリセプターの構築、および、シグナル伝達分子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。特に、生体高分子をもとにした蛍光性バイオセンサーを開発する意義と現状の問題点、RNA-ペプチド複合体を用いた新しいリセプターの構築法について記述されている。

第2章では、RNA-ペプチド複合体(RNP)を用いてシグナル分子であるリン酸化チロシンに対するRNPリセプターを作製した。タンパク質キナーゼによるタンパク質中のチロシン残基あるいはセリン、スレオニン残基のリン酸化を選択的に認識するリセプターは、細胞内シグナル伝達経路を理解する分子ツールとして不可欠である。RNAとペプチドから形成される安定なリボヌクレオペプチド複合体を用いて、RNAアプタマーを作製する*in vitro*セレクション法を応用することにより、有機小分子に対して特異的なRNPリセプターを構築した。RNAライブラリーとペプチドとの複合体からRNPライブラリーを形成し、*in vitro*セレクション法によりリン酸化チロシンに結合するRNPリセプターを作製した。リン酸化チロシンに対して特異的に結合するRNPリセプターは、チロシンもしくはリン酸化セリンに結合することはなく、リン酸化チロシンの芳香環とリン酸基に対して高い選択性と親和性を有していた。これにより、既に報告されているアデノシン三リン酸以外の分子に対してもRNPリセプターの作製が可能であることを示した。

第3章では、前章においてリン酸化チロシンを認識するRNPリセプターが作製できたことから、リン酸化チロシンだけでなく、その周辺のアミノ酸配列も高選択的に認識できるRNPリセプターを作製し、さらに、RNPリセプターをもとにして蛍光性RNPセンサーを構築した。天然タンパク質中に見られるリン酸化チロシンを含有するアミノ酸配列(Gly-pTyr-Ser-Arg)に対して*in vitro*セレクション法を利用してRNPリセプターを作製した。作製されたRNPリセプターは、リン酸化チロシンを含むテトラペプチドGly-pTyr-Ser-Argに対して、リン酸化チロシンの芳香環とリン酸基を高選択的に認識するだけでなく、リン酸化チロシン周辺のアミノ酸配列をも認識する人工リセプターであった。*In vitro*セレクションの条件の最適化することで、前章で作製したリン酸化チロシンに対するRNPリセプターと比べて、高い選択性と親和性を有するRNPリセプターが構築できた。次に、得られたGly-pTyr-Ser-Arg配列に対するRNPリセプターをもとにして、RNPリセプターのペプチドN末端に蛍光分子を導入することにより、RNPリセプターの三次元構造情報がなくても蛍光センサーが構築できることを示した。励起波長が350nmから650nmである蛍光分子を用いて、蛍光ペプチドライブラリーを構築した。RNAライブラリーと蛍光ペプチドライブラリーを組み合わせた網羅的なスクリーニングによって、Gly-pTyr-Ser-Arg配列に対する蛍光センサーの構築に成功した。得られた蛍光センサーは、もとのRNPリセプターと同じく、リン酸化チロシンを含むGly-pTyr-Ser-Arg配列に対して、高い選択性と親和性を示した。

第4章では、リボヌクレオペプチドを構成するペプチドサブユニットへの蛍光分子の導入法を改良することにより、蛍光

性 RNP センサーの性能を向上させることに成功した。蛍光分子とペプチドサブユニットの間をつなぐリンカー分子の開発と、蛍光分子とペプチドとの結合様式を変化させることにより、蛍光性 RNP センサーの作製法をより効果的な方法論として確立した。

第 5 章では、ATP やリン酸化チロシンとは異なった化学的性質を持つシグナル分子ドーパミンに対する RNP リセプターおよび蛍光性 RNP センサーの構築を行った。ドーパミンに対して高選択的な RNP センサーが作製できたことにより、蛍光性 RNP センサーは、個々のシグナル伝達経路に特徴的な種々の有機分子に対する蛍光性センサーを構築するための一般的な方法論となる可能性を示した。

第 6 章では、総括として、本論文で開発した蛍光性バイオセンサーの有用性と、環境保全型技術としての応用の可能性が論じられている。RNA とペプチドの安定な複合体を用いた、生体内シグナル伝達に関わる分子に対する蛍光性バイオセンサーの開発と、環境適合性の高い生体高分子を材料とした蛍光バイオセンサーの構築法の確立による、新しいセンシング技術への展望がまとめられている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、環境適合性の高い生体高分子を用いたバイオセンサー構築法の確立を目的として、RNA-ペプチド複合体 (RNP) を用いた生体内シグナル伝達分子を高選択的に捕捉するリセプターの開発とシグナル伝達分子を高感度で光学的に検出する蛍光センサーの開発について研究した成果をまとめたものであり、得られた主な結果は以下の通りである。

まず、シグナル伝達分子として、タンパク質中の特異的な位置に存在するリン酸化チロシンに注目し、RNA-ペプチド複合体 (RNP) を用いて、リン酸化チロシンに対する RNP リセプターを作製した。リン酸化チロシンを認識する RNP リセプターは、リン酸化チロシンの芳香環とリン酸基に対する選択性と親和性を有していた。つぎに、リン酸化チロシンだけでなく、その周辺のアミノ酸配列までも高選択的に認識できる RNP リセプターと蛍光性 RNP センサーの構築に成功した。特定の amino 酸配列に存在するリン酸化チロシンを高選択的に検出できるリセプター及び蛍光性バイオセンサーを作製したことにより、特定のシグナル伝達経路に関わるリン酸化タンパク質を高感度で検出できる蛍光性バイオセンサーの作製が可能であることを示した。加えて、蛍光分子の導入法を改良することで RNP センサーの感度を向上させることに成功し、蛍光性 RNP センサーの作製法をより一般的な方法論として確立した。

次に、リン酸化チロシンとは異なった化学的性質を持つシグナル分子として神経伝達物質ドーパミンに注目し、ドーパミンに対する RNP リセプターおよび蛍光性 RNP センサーを構築した。ドーパミンに対して高選択的な RNP センサーが作製できたことにより、本論文で開発された蛍光性 RNP センサー作製法は、個々のシグナル伝達経路に特徴的な種々の有機分子に対する蛍光性センサーを構築するための一般的な方法論となる可能性を示した。

本研究は、生体内シグナル伝達経路の解明に必要なセンシングシステムとして、生体高分子をもとにした高感度蛍光性バイオセンサーの一般的な構築法を開発するとともに、シグナル伝達分子および環境汚染分子を網羅的・統括的に検出する方法の開発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。