

|             |                                                |
|-------------|------------------------------------------------|
| 氏 名         | ほり え そう た<br>堀 江 壮 太                           |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (生命科学)                                     |
| 学 位 記 番 号   | 生 博 第 88 号                                     |
| 学位授与の日付     | 平 成 18 年 11 月 24 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 | 生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻                  |
| 学位論文題目      | DSL リボザイムの構造と生化学的解析ならびに精密構造制御された<br>RNP の設計と構築 |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 井 上 丹 教 授 石 川 冬 木 教 授 山 本 憲 二     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は二章から成る。第一章では、申請者のグループで最近開発された DSL リボザイムの構造と生化学的解析について述べられている。DSL リボザイムは「構造情報に基づく分子設計と *in vitro* セレクション法の併用」という新しい概念に基づき、三次元構造が規定された足場 RNA 上に *in vitro* セレクション法で取得された30ヌクレオチド長の触媒ユニットを挿入することにより作製された人工リガーゼリボザイムである。構造解析の結果、1) リボザイムの全体構造が、当初の設計通りのものであったこと、2) 触媒に必須な残基が同定され、それらが触媒ユニット中に存在することが示された。また、生化学的な解析の結果から、DSL リボザイムが活性を発揮するための条件は、これまでに知られている代表的なりボザイムと類似していることが示された。

第二章では、精密構造制御された RNP の設計と構築について述べられている。ポストゲノム時代のタンパク質の機能解析において、タンパク質間の距離、配向を精密に制御して固定化する技術が求められている。このような技術は、例えば、足場タンパク質上に固定化されたシグナル因子の相互作用を理解する際に有用である。また、基板上へのタンパク質の固定化など工学分野においても必要とされている。申請者は、足場 RNA 上の二つのタンパク質間の距離、配向が制御された RNP の構築を試みた。この方法は、操作技術が確立している RNA を足場とするため、操作が難しいタンパク質を足場とする場合に比べ、容易にタンパク質間の距離、配向を制御することが可能であると考えられる。分子全体の構造を RNA で規定し、必要に応じて一部にタンパク質を導入するという戦略に従って、RNP が設計、構築された。生化学的解析の結果、二つのタンパク質が足場 RNA 上に設計通りに結合していることが示唆された。また、足場 RNA 上に固定化された二つのタンパク質間、すなわち、CFP から YFP への FRET が観察されたことから、これらのタンパク質間の距離が10nm 以内に制御されていることが示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

第一章で述べられている、「DSL リボザイムの構造と生化学的解析」については、その結果と考察は、DSL リボザイムを基盤として新たな人工リボザイムを創製する際の指針となるものであると考える。具体的には、結論として、DSL-1S の構造に関しては、1) 全体構造が、当初の設計通りのものであったこと、2) 触媒に必須な残基が同定され、それらが触媒ユニット中に存在することが示された。また、生化学的な解析の結果から、DSL-1S が活性を発揮するための条件は、これまでに知られている代表的なりボザイムと類似していることが示された。これらの結果は、分子設計とセレクションの併用というリボザイム創製の新しい戦略の妥当性を示すものである。実際、申請者らは本研究を踏まえた上で、DSL-1S の改変を行い、新規な機能を持つリボザイムの創製に成功している。

申請者は、第二章「精密構造制御された RNP の設計と構築」について、足場 RNA 上に固定化された二つのタンパク質の距離、配向が制御された RNP を設計し、構築することに成功した。足場 RNA 上に固定化された CFP から YFP への

FRET が観察されたことから、これらのタンパク質間の距離が 10nm 以内に制御されていることが示唆された。RNP の設計、構築に関するこれまでの報告において、ほとんどの場合、RNP の中心の役割は RNA 因子が担っており、タンパク質因子の機能は、RNA の触媒活性の制御に限られていた。したがって、本研究でタンパク質因子間の反応を RNA 因子が媒介する RNP の構築に成功したことは注目に値する新規な研究成果である。以上より本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

さらに、平成18年10月12日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。