

Q. tRNA のアシル化の収率決定方法は?

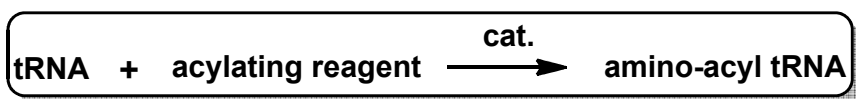
A. 単離収率ではなく、ゲル上の蛍光強度から算出しているみたいです。(Nat. Protoc. 2011, 6, 779. 図3より)

Q. CME エステルを用いている訳は?

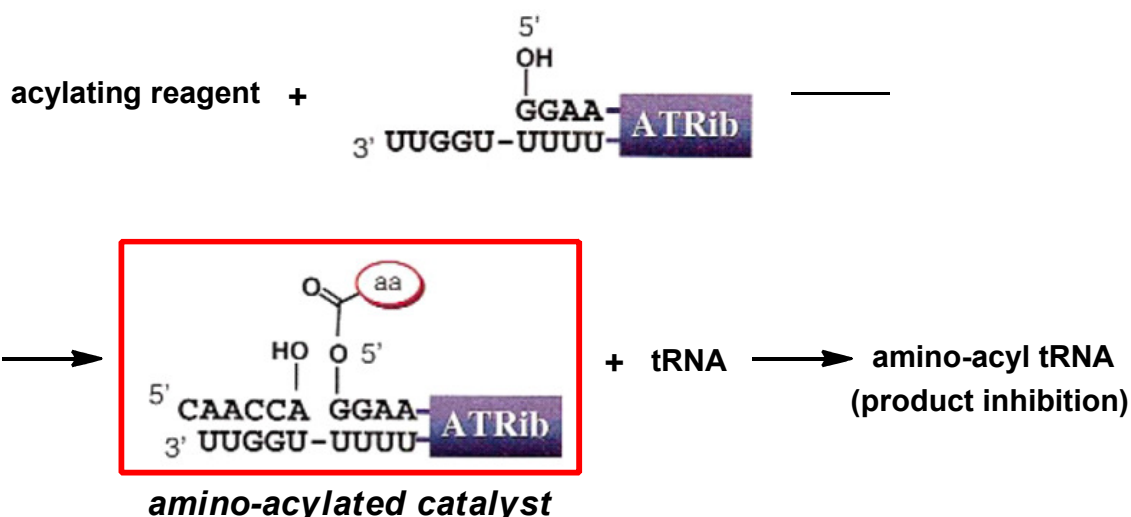
A. 非触媒的な反応(background)が無視できる程度に活性がある、水素結合能がない、といった特性から用いられています。(Nat. Struct. Biol. 2000, 7, 28.より)

Q. 1st generation と 2nd generation の違いをわかりやすく説明して(失敗と成功の本質)

A.



- 1st generation (ping-pong process) = indirect acylation



- 2nd generation (Flexizymes) = direct acylation, induced-fit



Flexizyme itself is not acylated.

① 両方とも trans-acting(分子間作用型)触媒なので違いが見えづらかったと思いますが(というか自分も質問されてはっきり認識したのですが)、1st generation は「アシル化された触媒」が介在します。一方で 2nd generation では、触媒がアシル化されることはなく、アシル化剤(アミノ酸)・tRNA とともに非共有結合により認識され反応が進行します。

② 時間の都合上述べられませんでした。1st generation の触媒は目的物による障害を受

けるため触媒の活性をどうしても一定以上向上させることが出来ないという問題があったみたいです。一方、2nd generation の触媒は induced-fit 型の作用を示し、フェニルアラニンが活性中心部位にある時だけ、tRNA の認識部分が適切に配置されるようです(論文を見ていると induced-fit 型の人工リボザイムだということを結晶構造から証明したということも結晶構造解析の論文が nature に掲載された理由の一つであるように見受けられます)。

Q. スライド 28 で示されているように FIT system で使われるアミノ酸は 9 種類のみか?

A. よく使われているのは、スライド 33 のように 16 ないし 17 種類のアミノ酸が存在するコドン表です。理論的には 64 種類対応させることが出来るはずですが、いくつかの理由によりこのようになっています。まず、アンチコドンの 3 番目の塩基認識が完璧ではないため、天然のコドン表に見られるように、あまり多くのアミノ酸を対応させることはできません(生物システムの問題)。次に、確実にチオエーテル結合による環化体を得るため、途中で終止コドンが出てこないよう、3 番目の塩基は U に固定されてあります(C でもよかったのかもしれませんが、実用上の問題)。後者の問題を考えなければ、20 種類は使えると思います(もしかしたら他にも何か問題があるのかもしれませんが)。

Q. Flexizyme や FIT system, RAPID system にかかるコストは?

A. コストのことは正直判らないですが、一つ言えることは今回のシステムでペプチドの大量合成するわけではないということです。あくまでもリード探索用です。非天然ペプチドの化学合成が将来どれくらい安くなるかは、、まあ頑張ります。

Q. マグネシウムの役割は? (そもそもどっから出てきた?)

A. RNA 骨格の安定性向上のために一般によく添加されるそうです。今回の場合でも、もともと触媒探索の段階で pool 中に入れてあったものであり、スライド 22・23 に示すようにマグネシウムイオン(ピンクの球)は触媒中心の骨格安定のため重要な役割を果たしています。

Q. スライド 9 で反応時間を 30mi から 3min に短縮している理由は?

A. 反応時間を短くすることで、ある程度活性のある集団の中から最も活性の高いグループを選び出すことが出来る(進化圧を上げる)ようです。

Q. G24 のグアニンとフェニルアラニン間でスタッキングしているのでは?

A. 僕も同じことを考え、そのための基質設計(芳香環を有するアミノ酸)だと思っていたのですが、実際はグアニンの 6 位カルボニル酸素と芳香環の相互作用のみのようです。また、活性がある触媒ではこのグアニンは全て保存されています。(Nature 2008, 454, 358.図 3d より)

Q. RNA を触媒として用いるメリットは？

A. ポリペプチド鎖と比べた場合の、RNA 鎖の触媒としての構造的優位性についての議論は難しいですが、RNA が優れている点は、プール(ライブラリーサイズ)の大きさ及び触媒探索の容易さ(in vitro screening などを用いた際の)にあると考えています。例えば、スライド 9 のプール 0 では 10^{15} 種類の RNA が一つの容器に入っています。この、サイズの多様性をポリペプチドや他の分子群で実現するのは困難なのではないのでしょうか？ また、今回の場合は、tRNA の認識に共通部位である-74CCA76を利用する可能性を考えても RNA を用いるメリットがあったかと思います(基質との適合性の観点)。

Q. 5' leader domain が pre-tRNA に保存されているにもかかわらず、実際の触媒機能がタンパク質性の現在のアミノアシル tRNA 合成酵素に取って代わられてのはなぜか？

A. 5' leader domain が実際に触媒機能を担っていたこと、またそもそも RNA ワールド仮説そのものも未だ仮説の域を出ない話です。ただ、一つ言えるのは既存のタンパク質性アミノアシル tRNA 合成酵素は-74CCA76 部位だけではなく、tRNA の他の部位も同時に認識し、適切なアミノ酸が結合されているかどうかの確認が何重にも施されているということです。

Q. Flexizyme の研究で、これまで不可能であった人工ペプチド合成が可能になったが、どんなところに Novelty や Originality があって、このブレイクスルーがあったのか？

A. 質問の意図が完全には読み取れなかったのですが(すいません)、Flexizyme そのものに関して言えば、Flexizyme と tRNA、それから容易に調整可能な活性化型アミノ酸基質をただ混ぜるだけで、任意のアミノ酸を任意の tRNA にくっつけることが出来た点にあったと思います。