

氏名	山 中 勝 弘
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	工 学
学位授与番号	博甲第2802号
学位授与の日付	平成16年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科システム科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Efficient synthesis of nonnatural mutants in E.coli S30 in vitro protein synthesizing system (E.coli S30 を用いた in vitro 蛋白質合成系における非天然変異蛋白質の高効率発現)
論文審査委員	教授 宋戸昌彦    教授 中西一弘    教授 山田秀徳

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

機能性側鎖を有する非天然アミノ酸の蛋白質への導入は、その人工機能を蛋白質に直接付与することができ、蛋白質の新たな応用を進める上で有用な手法である。しかしながら、目的の機能化を達成するためには、非天然アミノ酸を蛋白質の適切な部位へ導入する必要がある。

本研究室では4塩基を1つのコドンとして非天然アミノ酸に割り当てるフレームシフトサプレッション法により機能性基を特定部位に導入した蛋白質を遺伝子工学的に作製することに成功している。この手法は、その人工機能を蛋白質に直接付与することができ、定量的および網羅的な導入が可能になる。さらに蛋白質の構造機能解析や分子の挙動など蛋白質の新たな応用を進める上で有用な手法になると期待される。本論文では機能性非天然アミノ酸を部位特異的に導入した非天然変異体の高効率合成に有用な手法を開発した。

まず第2章ではE.Coli S30蛋白質合成系において非天然変異体の発現を抑制している因子を探索した。またアミノアシル tRNA の迅速な消失を補うため蛋白質生合成開始5分後にアミノアシル tRNA を追加することで大幅な発現量の増加が確認できた。また一般的なアミノアシル tRNA の精製法を確立した。この精製したアミノアシル tRNA を用いて細胞外蛋白質合成系に添加し、蛋白質の発現効率を検討した。3章ではアミノアシル tRNA の半減期を測定した。

さらに4章では電子伝達蛋白質であるシトクローム b5 (Cytb5)の種々の部位に強い電子受容性非天然アミノ酸である2-アンスラキノニルアラニンを導入し、Zn-ポルフィリンと再構成させることにより電子移動系の構築を確立した。

本論文では非天然アミノ酸を部位特異的に導入した非天然変異体の発現に影響をおよぼす様々な因子の解明に成功した。機能性アミノ酸の部位特異的導入はFRETマッピングによる蛋白質構造機能解析やプロテオミクスに有用なツールを提供するものである。

本研究で得られた結果は、機能性非天然アミノ酸を部位特異的に導入した非天然変異体の合成量の向上に役立つことが期待される。

## 論文審査結果の要旨

機能性非天然アミノ酸を蛋白質の特定の位置に導入することは、蛋白質の機能改変および構造解析に有用である。しかし非天然アミノ酸を導入した蛋白質は、蛍光で確認できる程度のごく微量しか得られないという問題点が残っていた。本論文第2章および第3章では大腸菌S30細胞外蛋白質合成系において非天然変異体の発現を抑制している因子を探索し、その結果化学的アミノアシル化の過程で副生する環状tRNAが阻害作用を示すことをはじめて発見した。さらにこの環状tRNAが生成しないアミノアシル化条件や精製条件を見いだすことに成功した。一方、環状tRNAが存在しない条件でもなお収量が低い原因として、非天然アミノ酸でアミノアシル化したtRNAの寿命が短いことを見だし、その原因として大腸菌中に存在するアミノアシルtRNA合成酵素による校正作用を指摘した。この短い寿命を補う実際的な方法として、合成途中で新しいアミノアシルtRNAを添加することが有効であることを見いだした。これらの発見により、大腸菌細胞外生合成系を用いた非天然変異蛋白質の合成収量を、野生型蛋白質の収量にほぼ等しくなるまで向上させることに成功した。

本論文第4章では大腸菌細胞外生合成系を用いてシトクロームb5蛋白質を合成し、その特定の位置にアンスリル基やアンスラキノン基をもつ非天然アミノ酸を導入した。これらの非天然変異蛋白質は蛋白質分子内で光励起エネルギー移動や光誘起電子移動を行うことを確認した。

以上のように本論文は細胞外生合成の詳細な機構にまで立ち入りながら収量向上に成功しており、今後非天然変異法を創薬などに広く応用することを可能にしたものである。よって本論文は博士（工学）として適当であると認められる。