

氏名	土井 芳朗
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4146号
学位授与の日付	平成22年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Expansion of protein biosynthesis system for the introduction of functional amino acids (種々の機能性アミノ酸導入のための蛋白質生合成系の拡張)
論文審査委員	教授 宍戸昌彦 教授 山田秀徳 教授 中西一弘 准教授 大槻高史

### 学位論文内容の要旨

Various types of nonnatural amino acids have been incorporated into proteins by using expanded protein-biosynthesis systems. However, there have been two problems remained unsolved, both concerning with aminoacyl tRNAs. The first problem is a difficulty in introducing nonnatural amino acids with large aromatic groups. The other problem is a short lifetime of nonnatural aminoacyl tRNA that causes low yield of nonnatural mutant proteins. In this thesis, the two problems were solved by introducing artificial components into the biosynthesis system.

In the first chapter, a brief introduction of protein biosynthesis system was described. Also recent attempts toward expansion the biosynthesis system to include nonnatural amino acids were described.

In the second chapter, an attempt to expand substrate specificity of the elongation factor Tu (EF-Tu)/GTP system was described. Since one of the possible reasons for the low incorporation efficiency of large-sized amino acids may be a limited affinity of EF-Tu against aminoacyl tRNAs with large amino acids. We synthesized various *E. coli* EF-Tu mutants, in which the binding sites for the aminoacyl-moiety of aminoacyl tRNA were modified to accept large-sized amino acids. Some of these mutants showed improved affinity toward aminoacyl-tRNAs charged with large nonnatural amino acids.

In the third chapter, the problem of short lifetime of aminoacyl tRNA was solved by introducing a photocleavable protecting group at the amino group of an aminoacyl tRNA. Under dark condition at 36 °C, the caged aminoacyl tRNA was stable and did not suffer deaminoacylation for at least 4 h in pH 7.6. The caged aminoacyl tRNA did not work in the translation system but did not inhibit the translation with standard amino acids. Upon irradiation of the caged aminoacyl tRNA for 10-20 sec, it was converted to active aminoacyl tRNA. The resulting free aminoacyl tRNA bound to EF-Tu and worked in the translation system to produce proteins. The caged Ser-tRNA with a CGGG anticodon was applied to achieve phototriggered translation of EGFP, whose mRNA contains a CGGG codon at the 214th position.

In the fourth chapter, results of this thesis were summarized and the future prospects by using the tools developed in this work were described.

## 論文審査結果の要旨

本研究は天然の20種類のアミノ酸に加えて、種々の非天然アミノ酸が導入された蛋白質を遺伝子工学的に作製する手法に関するものである。その手法で2つの未解決問題を解決したものである。

第1の問題は、大きなサイズの非天然アミノ酸の蛋白質導入効率が低いことであった。土井君はその原因が、アミノ酸結合tRNA（アミノアシルtRNA）をリボソームに運び込む酵素EF-Tuにあることを見抜いた。そしてEF-Tuの基質結合部位を改変することによって解決できることを示した。その結果ピレニル基のような大きな側鎖をもつ非天然アミノ酸の導入効率が大きく改善することを明かにした。

第2の問題としては、非天然アミノアシルtRNAの蛋白質生合成系中での寿命が短いことがあった。そのため、非天然アミノ酸導入蛋白質の収量が野生型蛋白質の収量よりかなり低くなることが問題であった。土井君は非天然アミノアシルtRNAの寿命はアミノ酸のN末端を保護することによって大きく延長できることを発見した。そこで同君は、光で簡単に除去できるN末端保護基を開発し、それで保護された新規アミノアシルtRNAを作製した。後者は蛋白質生合成系で安定に存在できるばかりでなく、20秒程度の短時間の光照射によって脱保護され、活性なアミノアシルtRNAになることが示された。この方法は非天然アミノ酸導入蛋白質の収量向上だけでなく、蛋白質合成のトリガリングや、光パターンニングにつながる新技術である。

以上のように、土井君の研究により、大きな側鎖をもつ非天然アミノ酸を効率よく蛋白質に導入する道が開かれた。これらの結果は近い将来の人工機能蛋白質作製につながるものであり、工学的に大きな意義を持つものである。したがって、本研究は博士（工学）の学位にふさわしいと認定される。