

氏名	村 上 裕
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2070号
学位授与の日付	平成12年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生物資源科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Synthesis and Artificial Functions of Mutant Proteins Incorporated with Nonnatural Amino Acids (非天然アミノ酸を導入した人工機能蛋白質の作製)
論文審査委員	教授 宍戸昌彦 教授 山田秀徳 教授 酒井裕

学位論文内容の要旨

非天然アミノ酸を蛋白質に導入することで従来の遺伝子工学ではできなかった新しい機能を持つ蛋白質を作成できる。本論文2章では、電子受容性アミノ酸を導入したストレプトアビジンを作製し、蛋白質中における電子移動について研究を行った。ニトロフェニルアラニンを用いたストレプトアビジンの様々な位置に部位特異的に導入し、ピレニルアラニンを連結したピオチンを結合させ、ピレニル基の蛍光の消光から電子移動速度定数を求めた。その結果、電子移動速度はドナー・アクセプター間の指数関数に比例することが分り、このことからニトロフェニルアラニンは指定した位置に導入できていることが分かった。

蛋白質の蛍光ラベルは、蛋白質の構造や機能を調べたり、基質結合のレポーターとして蛋白質を改変する方法として有用である。本論文3章ではアンスリルアラニンや、クマリン誘導体を部位特異的に導入したストレプトアビジンを作成し蛍光特性を検討した。様々な位置に蛍光性非天然アミノ酸を導入した蛋白質を調べた結果、メトキシクマリンを側鎖に持つホモアラニン誘導体を用い、これを120位に導入したストレプトアビジンが、ピオチンをnM オーダーで感度よく検出する事が分かった。

非天然アミノ酸を様々な位置に導入した蛋白質ライブラリー作成のため、本論文4章では、遺伝子のランダムな位置の3塩基を非天然アミノ酸をコードする4塩基に置換する変異法の開発を試みた。GFP遺伝子の環化ssDNA (センス鎖)を作成し、ランダムな位置で1箇所だけ切断して、その両端にリンカーを連結した。このとき5'末端に連結するリンカーはCGGT4塩基を残し、3'末端に連結するリンカーは3塩基を削り込むように、*Bci*VIの認識配列を配置した。PCRで増幅後、*Bci*VIで切断し環化してプラスミドにクローニングした。塩基配列解析の結果、こうして得た20万のコロニーの内、約25%においてランダムな位置の3塩基がCGGT4塩基に置換したGFP遺伝子を与えていると見積もられた。従ってライブラリーとしては十分な大きさである、約5万のライブラリーが構築できたことが分かった。本研究により得られた結果は、蛋白質工学を化学から生物分野の広い範囲で応用するための基礎として重要な貢献であるといえる。

論文審査結果の要旨

申請者は、非天然アミノ酸を部位特異的に蛋白質に導入する新手法を応用し、電子受容基である p-ニトロフェニルアラニンをストレプトアビジンの種々の位置に導入した。これらの非天然変異蛋白質についてビオチン修飾ピレニル基からの光誘起電子移動を測定し、速度定数の蛋白質内距離依存性を調べた。その結果、電子移動速度はニトロフェニルアラニンの導入位置から予想される距離の指数関数であらわされることが分かった。このことから、ニトロフェニルアラニンは予想された位置に正しく導入されていることが明らかになった。また申請者は蛍光性の新規非天然アミノ酸を合成し、それらをストレプトアビジンに導入することにより、ビオチンの極微量検出が可能であることを示した。これにより蛍光性の非天然変異蛋白質が微量生体分子の蛍光検出に応用できることを示した。さらに申請者は非天然アミノ酸をランダムな位置に導入した蛋白質ライブラリーの作製を可能にする新手法を開発した。従来非天然アミノ酸を導入した変異蛋白質は変性して活性を失い易い点が大きな問題であったが、この新規ライブラリー作製技術の開発はその問題を解決する有力な手法である。

以上のように申請者は非天然アミノ酸の蛋白質への導入手法を確立し、その応用可能性を明らかにするとともに、さらに応用範囲を広げる新手法の開発に成功している。これらの成果は学術的および工学的寄与が大きいものである。よって博士（工学）の学位を授与するにふさわしいと認める。