

氏名	村 中 宣 仁
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2701号
学位授与の日付	平成16年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Synthesis of novel proteins containing nonnatural amino acids at desired positions (非天然アミノ酸を特定部位に導入した新規蛋白質の作製)
論文審査委員	教授 宍戸 昌彦 教授 山田 秀徳 教授 大森 斉

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

機能性基を蛋白質の特定部位に組み込むことは、蛋白質の機能改変、および構造機能解析に非常に有効である。本研究室では、通常の遺伝子コードである3塩基コドンに拡張した4塩基コドンを用いて、天然には存在しないアミノ酸（非天然アミノ酸）に割り当てることで、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、これまでの化学修飾では困難であった、機能性基の部位特異的、かつ定量的な導入を可能にしており、蛋白質の機能改変、および構造機能解析をするうえで極めて有力な手法になると期待される。

本論文では、機能性基を含む非天然アミノ酸の部位特異的導入が、蛋白質の機能改変、および構造機能解析に有用であることを示した。まず1章では、光異性化能をもつアゾベンゼン基を酵素の基質結合部位に特異的に導入した。それにより、酵素活性を効率良く光制御できる新規機能性酵素を作製できた。2章では、ダンシル基の導入効率が向上するような非天然アミノ酸を探索した。さらに導入したダンシル基の蛍光波長から導入部位の局所環境を予測できた。また3章では、分子進化的な手法を利用して目的の機能を持つ新規蛋白質を効率良く取得する系を確立している。さらに4章では、3章で確立した系を応用して、生体分子と結合する非天然アミノ酸を含むペプチドリガンドを選択取得する系の確立している。

本論文で示した非天然アミノ酸の蛋白質への部位特異的導入は、ポストゲノム時代に重要な数多くの蛋白質の挙動の網羅的探索、すなわちプロテオミクスに新たな手法を提供するものである。さらに本手法は分子レベルから細胞、さらには、生物の仕組みを探る有力な道具として、生物化学や化学生物学の分野で広く利用される事が期待できる。

論文審査結果の要旨

本論文は5章からなっている。第1章では蛋白質生合成系を拡張して、非天然アミノ酸を導入した蛋白質を作製する手法（非天然変異法）の意義と実際の方法について概説している。とくに非天然アミノ酸の位置を指定するための4塩基コドン法について詳しく解説し、他の方法に比べてその特長と短所について述べ、第2章以降への導入としている。第2章では非天然変異法を用いて、光異性化する側鎖をもつアミノ酸を西洋わさびペルオキシダーゼに導入している。当該アミノ酸を特定の位置に導入することにより、酵素反応を光照射によってオン・オフ制御することに成功している。第3章では非天然変異法により蛋白質の種々の位置に蛍光基を導入し蛋白質の構造解析を行っている。とくにダンシル基を結合したアミノ酸をストレプトアビジンの種々の位置に導入すると、その蛍光波長が位置によって変化することを見だし、これを利用して蛋白質中の局所的な誘電率を評価している。これは蛋白質構造解析の新しい手法である。第4章では非天然アミノ酸を導入した蛋白質のライブラリーから、特定のリガンドと結合するものをスクリーニングする新方法を提案している。実際には非天然変異ストレプトアビジンのスクリーニング系を確立している。第5章ではこの方法を用いて、4種類の非天然アミノ酸を含む24種類のアミノ酸からなる10アミノ酸ペプチドのライブラリーを作製し、ストレプトアビジンに結合するものをスクリーニングしている。その結果ベンゾイルフェニルアラニンを含むペプチドがストレプトアビジンと特異的に結合することを見いだしている。

以上のように本論文では非天然変異法の新しい展開が示され、創薬などに有用な新しい技術を提供している。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。