

氏名	平良 光
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3030号
学位授与の日付	平成17年 9月30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	Development of novel tRNAs for efficient incorporation of nonnatural amino acids (効率の良い非天然アミノ酸の導入のための新規 tRNA の開発)
論文審査委員	教授 穴戸 昌彦 教授 大森 齊 教授 山田 秀徳

学位論文内容の要旨

種々の人工機能基を蛋白質の特定部位に組み込むことは蛋白質の構造や機能の解析、および新規の機能を有する蛋白質の開発において有用である。本研究室では、通常の遺伝コードである3塩基コドンを経張した4塩基コドン、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、種々の機能基を特定部位に導入した蛋白質を合成することを可能にしている。これにより、これまでの化学修飾では困難であった機能基の部位特異的かつ定量的な導入が行えるようになり、蛋白質の機能経張や構造機能解析を行う上で有力な手法となっている。しかし、この手法は非天然アミノ酸の蛋白質への導入効率が低いという問題を抱えている。そこで、本論文では非天然アミノ酸の効率的な導入を可能とするため、新規4塩基コドン、および新規tRNAの開発を行った。

1章では、これまでに報告されている非天然アミノ酸の蛋白質への部位特異的導入法を紹介し、それらの利点と欠点について概説した。また、本研究を行う目的についても述べた。2章では、真核生物の代表的な無細胞翻訳系であるウサギ網状赤血球の抽出液において様々な4塩基コドンの有用性を調べ、有用な4塩基コドンを新たに見出した。3章では、非天然アミノ酸を効率よく導入できるtRNAを開発する手法として、tRNAの*in vitro*セレクション法を確立し、その手法が有効であることを証明した。4章では、3章で確立した手法を用いて、非天然アミノ酸を非常に効率よく導入できるtRNAを取得することを試みた。5章では、生物由来のtRNAライブラリーからの非天然アミノ酸を効率よく導入できるtRNAをスクリーニングする手法を開発し、実際に非天然アミノ酸を非常に効率よく導入できるtRNAを開発することに成功した。

今回開発した新規の4塩基コドンおよびtRNAまたその開発手法は、ポストゲノム時代において数多くの蛋白質の機能や構造を網羅的に調べるための基盤技術として生命科学の発展に寄与するものと期待される。

論文審査結果の要旨

本論文は蛋白質に非天然アミノ酸を導入する手法に関して、コドンの拡張とtRNAの最適化についての問題を解決したものである。従来非天然アミノ酸を割り当てるのに4塩基コドンが用いられてきたが、これは大腸菌でしか詳細に調べられていなかった。第2章では4塩基コドンをウサギ赤血球細胞中で用い、もっとも効率よく翻訳できるコドンの探索を行った。その結果CUCUなどいくつかの実用的に使用できるコドンが見出され、4塩基コドン法がウサギ系でも使用できることが確認された。

一方、蛋白質に非天然アミノ酸を導入するためには、それらを蛋白質生合成系中に存在するtRNAとは独立なtRNA（直交tRNA）に担持させる必要がある。直交tRNAの満たすべき条件としては、生合成系を行うリボソームに効率よく結合すること、および生合成系中に存在するアミノアシル化酵素によるアミノアシル化を受けないことが上げられる。本論文ではこれらの条件を満たし、4塩基コドン法による非天然アミノ酸導入に最適化されたtRNAを見出すための新手法を開発し、それを用いて実際に最も効率の高いtRNAを見出すことに成功している。第3章では4塩基コドンを導入したことによって歪が生じたと考えられるアンチコドンループの最適化を行い、CU-4塩基コドン-AUの配列が最適であることを見出している。第4章ではさらに広い範囲の配列についてtRNAの最適化を行っている。また第5章では大腸菌中のtRNAについて、それらに非天然アミノ酸を担持させてアンバーコドンによる非天然アミノ酸導入を行うのに最適なものを探索している。その結果トリプトファンtRNAが最適であることを見出している。

蛋白質への非天然アミノ酸導入は創薬、診断などの分野で今後大いに利用されるべき技術であり、それを実用レベルにすることは非常に重要である。本論文はそのなかでもコドンの拡張やtRNAの最適化を行ったものであり、工学的に価値が高い。したがって、博士（工学）としてふさわしいものと認められる。