

氏 名	お がわ あつ し 小 川 敦 司
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学位記番号	工 博 第 2620 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Development of New <i>In Vitro</i> Display/Selection Methods for Proteins and Nucleic Acids (タンパク質および核酸の新規試験管内提示・選択法の開発)
論文調査委員	(主 査) 教 授 青 山 安 宏 教 授 今 中 忠 行 教 授 濱 地 格

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、機能的核酸やタンパク質の選択のための非常に簡便で有用なツールとなっている試験管内選択法や提示法に関して、従来法における幾つかの問題点を克服した新手法の開発とその応用例に関する研究についてまとめたものであり、序論、本論5章、結論から構成されている。

序論では、生物の進化の問題から試験管内選択法や提示法の開発に至るまでの歴史および近年の発展について詳細にまとめられている。さらに、後半では、それらの方法の問題点をとりあげ、本論文の研究意義について述べられている。

第1章では、天然型 mRNA を鋳型とした全長タンパク質の提示法の開発について示されている。従来の試験管内タンパク質提示法においては、鋳型からのタンパク質解離を防ぐため、また、全長タンパク質を提示するため、鋳型 mRNA を改変する必要があった。本章では、これらの制限を除去するために、全ての終止コドンに対応する抑制 tRNA を用いた全センスコドン翻訳システムを構築しており、このシステムを利用した提示法においては、上記制限が解消され、天然型 mRNA を鋳型とした全長タンパク質の提示が可能となることが示されている。

第2章では、タンパク質翻訳システムに関わる生体分子を試験管内で選択する方法の開発について示されている。試験管内選択法は、タンパク質翻訳システムを利用するため、それに関わる生体分子の選択は困難であったが、本章では、第1章の手法を逆相ミセル中にて応用することにより、タンパク質翻訳システムに関わる分子を選択することが可能であることを示している。実際例としては、mRNA-tRNA 融合体を用いて、抑制 tRNA の選択を行っており、この新手法の有効性が実証されている。

第3章では、巨大タンパク質の特定の局所部位に特異的に結合する核酸分子（アプタマー）の選択法の開発について示されている。本手法は、切り出した標的局所部位に結合する核酸分子を選択した後、タンパク質全体を標的とした選択を行うという二段階選択法である。本章では、本手法を用いて、230kDa からなる巨大細胞接着タンパク質フィブロネクチンの活性部位（わずか3アミノ酸残基）に特異的に結合する DNA 分子（DNA アプタマー）を選択することに成功している。また、得られた DNA アプタマーが、実際に細胞接着を阻害することを確認している。

第4章では、大腸菌のタンパク質合成終結因子に特異的に結合する RNA 分子（RNA アプタマー）を多段階選択法により選択している。さらに、この RNA アプタマーを固定化させたカラムを用いることにより、大腸菌の抽出液から終結因子を効率的に除く方法についても示されている。また、本章では、この方法が、第1章の手法に必要な全センスコドン翻訳システムとして利用できるだけでなく、新機能的タンパク質創製のための非天然アミノ酸導入のツールとしても用いることができることをも示している。

第5章では、糖転移反応を触媒する新機能的 RNA（リボザイム）を選択している。細胞膜に多く存在する膜タンパク質は、糖付加されるアミノ酸残基や付加される糖の種類が限定されているが（プロテインコード）、本章で選択されたりボザイムは、従来のプロテインコードには見られない糖転移反応を触媒しており、コードの拡張につながっている。また、この

リボザイムの発見は、進化の初期過程において、RNA が生体反応を触媒していたという RNA 世界仮説を支持するものでもある。

結論では、本論文で開発された新手法の展望に触れながら、本論文で得られた成果について要約されている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、従来の試験管内選択・提示法における幾つかの問題点を克服した新手法の開発とその応用例に関する研究について記述されたものであり、主な成果は以下に示すとおりである。

(1)天然型 mRNA を鋳型とした全長タンパク質の提示法を開発した。

従来の試験管内タンパク質提示法においては、鋳型からのタンパク質解離を防ぐため、また、全長タンパク質を提示するため、鋳型 mRNA を改変する必要があったが、この新手法においては、全センスコドン翻訳システムを構築することによってこれらの制限を除去することに成功した。

(2)タンパク質翻訳システムに関わる生体分子を試験管内で選択する方法を開発した。

試験管内選択法は、タンパク質翻訳システムを利用するため、それに関わる生体分子の選択は困難であったが、(1)の手法を逆相ミセル中にて応用することにより、この新手法の開発に成功した。実際例としては、抑制 tRNA の選択を行い、本手法の有効性を確認した。

(3)巨大タンパク質の特定の局所部位に特異的に結合する核酸分子の選択法を開発した。

本手法は、切り出した標的局所部位に結合する核酸分子を選択した後、タンパク質全体を標的とした選択を行うという二段階選択法であり、実際例として、230kDa からなる巨大タンパク質のわずか3アミノ酸残基に特異的に結合する核酸分子を選択することに成功した。

(4)大腸菌のタンパク質合成終結因子に特異的に結合する核酸分子を多段階選択法により選択した。また、この核酸分子を用いて大腸菌の抽出液から終結因子を効率的に除く方法を開発した。さらに、本手法が、(1)の手法に必要な全センスコドン翻訳システムとして利用できるだけでなく、新機能性タンパク質創製のための非天然アミノ酸導入のツールとしても用いることができることをも示した。

(5)糖転移反応を触媒する新機能性 RNA を選択した。

この発見は、進化の初期過程において、RNA が生体反応を触媒していたという RNA 世界仮説を支持するものである。

以上、本論文は、機能性核酸やタンパク質の選択のための新規試験管内選択・提示法の開発とその応用例を示したものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成18年1月23日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。