

氏 名	はぎ 萩 はら 原 まさ 正 き 規
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第64号
学位授与の日付	平成15年3月24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	エネルギー科学研究科エネルギー社会・環境科学専攻
学位論文題目	生体内情報発現の制御を目指した人工タンパク質の分子設計に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 牧野圭祐 教授 尾形幸生 教授 坂 志朗

### 論 文 内 容 の 要 旨

生物の細胞内ではクリーンなエネルギー生産とエネルギー利用が行われており、地球環境保全の観点から、細胞内でのエネルギー生産・利用原理に基盤を置く新規エネルギー生産・物質変換システムの開発は重要な課題である。本論文では、化学的手法と生物化学的手法を駆使することによって、次世代エネルギー生産・物質変換システムのための新しい機能性分子設計方法論を開発することを目的として、(1)RNAとペプチド複合体を用いた人工リセプターの構築方法、(2)天然のDNA結合タンパク質に比べて熱安定性にすぐれた人工DNA結合タンパク質の作製法、(3)人為的に作製したDNA結合タンパク質の標的配列を簡便に解析する方法論、を開発した結果をまとめており、三章からなっている。主な内容は以下の通りである。

序論では、本研究に関連した生体高分子の分子設計法について解説し、本研究の目的を示したうえで、このような方法と本研究の関連について述べている。

第一章は、RNAとペプチド複合体を用いた人工リセプターの構築方法に関する研究結果を述べている。ここでは、高度な機能を持つことが期待されるドメインとしてRNA-ペプチド(リボヌクレオペプチド)複合体に着目し、既知の生体高分子三次元構造を利用した分子設計方法と多様な分子ライブラリーから合目的分子を選択する *in vitro* セレクション法を併用して、分子認識能を有する機能性ドメインの設計を行い、アデノシン三リン酸(ATP)に対する人工リセプターを作製している。この結果から、RNAとペプチドをサブユニットとした複合体をデザインすることによって人工リセプター作製が可能であることを示している。

第二章では、天然のDNA結合タンパク質に比べて熱安定性にすぐれた人工DNA結合タンパク質の作製法に関する研究結果を述べている。熱安定性に優れたタンパク質であるピリンのヘッドピースと転写因子GCN4の両方のアミノ酸配列を有効に組み込んだ人工タンパク質を遺伝子組み替えによって作製した。作製したDNA結合タンパク質は天然のDNA結合タンパク質であるGCN4よりも高い熱安定性を示したことを述べている。さらには円二色性偏光解析やゲル電気泳動解析法等を駆使して、この新規人工タンパク質のDNA結合様式を詳細に解析し、DNAとの結合の際に誘起されるタンパク質の立体構造変化が分子認識能に重要な役割を担うことを示している。

第三章では、人工DNA結合タンパク質の標的塩基配列を簡便に解析する方法論開発に関する研究結果をまとめている。任意のアミノ酸配列をもった短鎖ペプチドが認識するDNA塩基配列の選択法として、SAAB法(selected and amplified binding site imprinting technique)と、アダマンタンとシクロデキストリンの包接体形成を利用したペプチド二量体形成法を組み合わせ、この方法によって認識塩基配列が特定できることを明らかにし、短鎖ペプチドの標的DNA塩基配列を決定する一般的方法を開発し、結果を述べている。さらには、この方法をD-アミノ酸から構成されるペプチドにも展開し、天然型と同様に塩基配列を認識するペプチドを構築することに成功し、細胞系で分解されない新規DNA塩基配列認識・結合ペプチドの開発指針を述べている。

総括では、本論文の各章で得られた知見をまとめている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では、次世代エネルギー生産・物質変換システムとして、生体エネルギーを利用することを目指し、細胞の情報発現を外部から人為的に制御するための機能性分子作製のための方法論について実験的に研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

(1)細胞情報を制御するためには、情報伝達に関わる分子を捕捉することが可能な分子を作製することが必要であると考え、新たな人工リセプター分子の開発を行った。具体的には、三次元立体構造が解析された RNA-ペプチド複合体の構造を基にした分子設計を行い、RNA およびペプチドの2つのサブユニットを組み合わせたリボヌクレオペプチドのライブラリーから、ATP に選択的に結合するリボヌクレオペプチド複合体を *in vitro* セレクション法により選択した。ここで開発したリボヌクレオペプチド人工リセプターは、高い選択性で分子認識を行った。また、RNA サブユニットおよびペプチドサブユニットは協同的に ATP に結合することを明らかにした。これらの結果から、RNA-ペプチド複合体を利用した分子設計がテーラーメイドな基質分子結合場の作製に有効な方法であることを示した。さらにペプチドサブユニットを修飾することによる、親和性や選択性の増強等のリボヌクレオペプチドの機能拡張の可能性を提示した。

(2)人工的に遺伝子発現を制御することが可能な人工転写制御タンパク質の作製を目指して、生体内で有効に機能を発揮するために熱安定性の高い DNA 結合ドメインの作製を行った。熱安定性に優れたタンパク質であるピリンのヘッドピースと転写因子 GCN4 の両方のアミノ酸配列を有効に組み込んだ人工タンパク質を遺伝子組み替えによって作製した。この人工 DNA 結合タンパク質は、天然の GCN4 と比較して高い熱安定性を有しており、DNA 結合領域は構造転移を伴わずに DNA に結合することを明らかにした。さらに、*induced fit* メカニズムが GCN4 の塩基配列認識において重要な役割を担っていることを明らかにした。

(3)人工短鎖 DNA 結合性ペプチドの開発にとって必須の課題である認識配列決定法を確立することを目的として、ホスト-ゲスト包接錯体形成を利用した異種ペプチド二量体形成法と SAAB 法 (*selected and amplified binding site imprinting technique*) を組み合わせた新たな方法論を開発した。この方法によって認識塩基配列が特定できることを明らかにし、短鎖ペプチドの標的 DNA 塩基配列を決定する一般的方法を開発した。さらには、この方法を D-アミノ酸から構成されるペプチドにも展開し、天然型と同様に塩基配列を認識するペプチドを構築することに成功し、細胞系で分解されない新規 DNA 塩基配列認識・結合ペプチドの作製法を開発した。

以上、本論文は、生体内情報伝達の制御を目指した人工タンパク質創製のための新たな方法論を提示するものであり、得られた成果は学術上、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(エネルギー科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年2月5日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。