

氏名	遠藤太志
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第2896号
学位授与の日付	平成20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	工学研究科合成・生物化学専攻
学位論文題目	Studies on a Novel System for Cell-free Protein Synthesis Based on the Hyperthermophilic Archaeon, <i>Thermococcus kodakaraensis</i> (超好熱始原菌 <i>Thermococcus kodakaraensis</i> を用いた無細胞タンパク合成系に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 今中忠行 教授 青山安宏 教授 濱地 格

論文内容の要旨

本論文は、超好熱菌の一つである超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* を無細胞抽出液のソースとして用い、これまでに報告例がなかった高温で反応可能な無細胞タンパク合成系を構築した。さらに、本系を用いた応用についての実験も行った。その成果についてまとめたものであり、序論、本論2部4章、結論から構成されている。

序論では、無細胞タンパク合成システムの説明と先行研究の現状、超好熱菌の進化的な位置づけ、本研究に用いた *T. kodakaraensis* の諸性質に関して、および本研究の意義などがまとめられている。

第1章では、*T. kodakaraensis* を用いた高温でも機能する無細胞タンパク合成系の構築について述べている。レポータータンパクとして本菌由来キチナーゼ ChiA Δ 4 を用いた。大腸菌の系で用いられている無細胞抽出液の調製方法を元にして、*T. kodakaraensis* 無細胞抽出液 (S30画分) を調製した。ChiA Δ 4 をコードする mRNA を系に添加してタンパク合成反応を行ったところ、40~80℃ (最適温度60~65℃) とこれまでにない高温において活性型 ChiA Δ 4 の合成が可能であることを明らかにした (最大合成量約1.3 μ g/mL)。さらに、T7 RNA polymerase を添加して2段階の反応 (40℃~60℃) を行う事で、DNA からの転写・翻訳カップリング反応系の構築が可能であることを示した。

第2章では、*T. kodakaraensis* 無細胞タンパク合成系のタンパク合成量を増加させる方法について述べている。実際には、以下の改良を行った。①S30画分の調製方法の改良 (細胞破碎条件の最適化、プレインキュベーション操作の廃止)、②反応溶液組成の最適化 (系に添加する各因子の最適濃度の決定)、③遺伝子組換え技術を用いた宿主の改良 (ヒートショック転写抑制因子である *phr* 破壊株の作製)。その結果、本系のタンパク生産能力を約90倍に増加させることに成功し、ChiA Δ 4 の最大合成量として約115 μ g/mL を達成した。また、このときのタンパク生産速度は約100 μ g/mL/15minであった。これらの数値は、現在実用化されている大腸菌などの系と同程度であり、本系が非常に高速かつ強力なタンパク合成システムであることを示した。

第3章では、本系の応用に関する試みとして、異種タンパク質の合成実験について述べている。実際の実験では、耐熱性を有する Thermostable GFP (tGFP) の合成を試みた。その結果、本系を用いて活性型 tGFP の合成が可能であることを示し、その際に以下の手法が有効であることを示した。①コドン使用頻度の最適化による翻訳効率の上昇、②mRNA の3'末端に stem-loop 構造を付加することによる mRNA の安定性の向上、③ chaperonin タンパクの添加による合成タンパクの folding 効率の向上。

第4章では、一本のポリシストロニックな mRNA からの複数のタンパク合成実験について述べている。実験には本菌由来 TK0944-TK0943 オペロンを用いた。TK0944-TK0943 は acetyl-CoA synthetase の大小サブユニットをコードし、本酵素は $\alpha_2\beta_2$ から成るヘテロ4量体を形成する。本オペロンをコードする mRNA を用いてタンパク合成反応を行い、ウェスタンブロット解析により解析を行った。その結果、TK0944 と TK0943 タンパクの合成が共になされていることを確認し、

本系を用いた複数遺伝子産物の合成が可能であることを示した。

結論では本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* に由来する無細胞抽出液を用いた高温でも反応可能な無細胞タンパク合成系の開発、およびその応用に関する成果をまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

(1) *T. kodakaraensis* の培養菌体より無細胞抽出液を調製し、本菌由来のキチナーゼ ChiA $\Delta 4$ をコードする mRNA を用いた無細胞タンパク合成反応を行った。その結果、反応の最適温度が60-65℃という、これまでにない高温下で機能する無細胞タンパク合成系の構築に成功した。続いて、無細胞抽出液の調製方法・反応溶液組成・使用菌株などの検討を行うことにより、本系のタンパク生産能力を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上に向上させることに成功した。この生産能力は現在実用化されている大腸菌の系と同程度であり、本系が非常に強力な無細胞タンパク合成システムであることを示した。

(2) 本系の応用を目的として、異種タンパク質である tGFP の合成を行った。その結果、活性型 tGFP の合成が可能であることを示し、この過程で以下の3つの手法（遺伝子コドンの改変、mRNA へのステムループ構造の付加、反応系へのシャペロニンの添加）が効果的であることを見出した。さらに、本系を用いて一本のポリシストロニックな mRNA から、実際に複数タンパクが合成可能であることを示した。

以上、本論文では、これまでに報告例がない高温環境で機能する無細胞タンパク合成系の開発を行い、さらにその応用の可能性を示した。本系の開発は、これまでのシステムでは生産が困難であったタンパク質や、新規な耐熱性タンパク質などの新たな合成手段に成り得ると考えられ、学術上および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定した。また、平成20年1月30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。