

審査の結果の要旨

氏名 日比 敬太

本論文は六章から構成されている。第一章では本研究の背景、概要について述べられており、tRNA のエンジニアリングによる非天然アミノ酸導入を軸とした、遺伝暗号改変のタンパク質工学における位置づけ、社会的期待、その技術的課題について述べられている。その上で、無細胞タンパク質合成系における tRNA 成分の試験管内再構成に焦点が当たったこと、および先行研究において構築されてきた系の特性や技術的課題が述べられている。そして、本論文において試験管内転写 tRNA のみによって機能を持ったタンパク質を合成できる系が初めて構築され、さらにその系を基にセンスコドン再配置系の構築に成功したこと、修飾塩基の導入によるタンパク質合成効率向上を検討したことが概説されている。

第二章では、本研究で用いられた実験材料、17 種類のタンパク質の精製法、および、試験管内での RNA 転写、精製法について述べられている。本研究で修飾塩基導入のために用いられた酵素群が、個々に高い精製度で調製されたことが示されている。また、本章において、本論文で行われた生化学実験の方法についても説明されている。

第三章では、試験管内転写 tRNA によるタンパク質合成系の構築およびその特性について述べられている。本研究では、先行研究において課題であった修飾塩基が機能に必須である tRNA の存在を、tRNA を各アミノ酸、開始メチオニンにつき一種類ずつに絞る選択、一部 tRNA のコドン改変によって克服したことが述べられている。また、今回調製された各 tRNA は修飾塩基を一切持たないものの、本来受容すべきアミノ酸のみを受容し、ミスアミノアシルーションが起こらないことが示されている。試験管内転写 tRNA によるタンパク質合成実験では、大腸菌由来 tRNA を用いた場合と異なり、30°Cの方が37°Cと比較してタンパク質合成効率が良くなり系の最適温度が移動したことを示唆した。さらに、試験管内転写 tRNA のタンパク質合成効率はいくつかの tRNA 種の非効率さによって規定されていること、それら tRNA 種を単独ではなく混合して過剰に添加することで、タンパク質合成効率を大きく向上させられることが示されている。合成されたジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)の活性測定では、非効率な tRNA 群を過剰に添加した条件で大腸菌由来 tRNA を用いた場合と同等の比活性を有する DHFR が合成できることが観察され、試験管内転写 tRNA によって機能を持ったタンパク質が合成可能な系の構築が示された。系の発展として、tRNA^{Ala} のアンチコドン改変体を用いることで UCG コドンをアラニンとして解読するような遺伝暗号改変系の構築も示されていた。本章の最後では、tRNA^{Ile}、tRNA^{Pro}、tRNA^{Glu} への修飾塩基の導入による系の効率向上が図られており、修飾塩基の導入がアミノアシルーション効率を向上させること、これら 3 つの tRNA 群への修飾塩基導入によって DHFR 合成効率が 7 倍程度になることが述べられている。

第四章では、本論文の総括および考察が行われている。本論文において構築された系の概略とその特性が総括され、今後の発展に向けた戦略が述べられている。今回用いられた修飾塩基を導入による効率向上だけでなく、分子進化手法を用いたアミノアシル tRNA 合成酵素の改変による戦略など今後の発展の可能性についても述べられている。また、合成生物学の目標である自己

複製可能な系の構築と本研究の連続性についても言及されている。

第5章では参考文献が、第六章では謝辞が述べられている。

本論文は、試験管内転写 tRNA のみによって機能を持ったタンパク質が合成可能な系の構築が示されており、また、簡便にセンスコドンの遺伝暗号改変が行えること、いくつかの修飾塩基の導入で効率向上が望めることを示している。これらの知見は、タンパク質工学、合成生物学において重要であると考えられる。

よって、本論文は博士(科学)の学位請求論文として合格と認められる。

以上1665字