

Title	生体外タンパク質合成反応の活用と効率化技術に関する研究
Author(s)	北岡, 義久
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42917
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	北 岡 義 久
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 1 年 6 月 2 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	生 体 外 タ ン パ ク 質 合 成 反 応 の 活 用 と 効 率 化 技 術 に 関 す る 研 究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 関 達 治 (副査) 教 授 金 谷 茂 則 教 授 原 島 俊 教 授 室 岡 義 勝 教 授 吉 田 敏 臣

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体外タンパク質合成反応の活用と効率化技術に関する研究をまとめたもので、緒論、本論4章および総括の6章よりなっている。

第1章では、本研究の背景となる研究を紹介し、研究の目的を述べている。

第2章では、生体外タンパク質合成反応を用いたタンパク質の高次構造形成機構の解析を行っている。酵素リシンA鎖をモデルタンパク質として同反応で合成したところ、分子シャペロンによるリボソーム上のPeptidyl tRNAからのポリペプチド遊離促進作用が、リボソーム上で合成されるリシンA鎖ポリペプチドのco-translationalな高次構造形成反応の終盤段階に関与していることを新たに示している。

第3章では、合成されたタンパク質の酵素活性の評価を定量的に行うことで、生体外タンパク質合成反応の酵素機能解析における有用性を述べている。リシンA鎖の活性中心以外に数アミノ酸の欠損を導入した数種類の変異型酵素を、生体外タンパク質合成反応で調製し、これらの速度論的評価を行ったところ、これまで酵素機能への関与が不明であった、活性中心から立体配置上離れた位置にあるC末端領域も、触媒反応に関係していることを明らかにしている。

第4章では、生体外タンパク質合成反応の効率化を目指す上で重要な反応律速因子の解明について述べている。回分式生体外タンパク質合成反応において、mRNAを鋳型とする翻訳系ではmRNAの分解が、転写-翻訳カップリング系ではNTPの枯渇が、各々の反応系の律速因子であることを明らかにしている。次に、連続的に生体外タンパク質合成反応を行う連続システムを構築している。連続システムでは、NTPの連続供給によってタンパク質合成反応の停止が回避され、長時間の合成によるタンパク質合成量向上が実現されたと推察される結果を示している。

第5章では、生体外タンパク質合成反応の効率化技術の開発について述べている。先ず、分子シャペロン画分の含有量を増加させた細胞抽出液を用いることで、合成タンパク質の比活性が約2倍に上昇することを示し、回分式反応での活性タンパク質の回収率向上の手法となることを示している。次に、連続システムにおいて、低濃度の界面活性剤を添加することで、タンパク質合成量が50%増加したことから、界面活性剤添加による効率化手法の有効性を示して

いる。

第6章では、本研究で得られた結果を総括し、将来展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

生体外タンパク質合成反応は、細胞の有するタンパク質合成機構を再現できるとともに、タンパク質の発現が容易に行える特徴がある。また、発現可能なタンパク質の制約が少ないことから、効率化によって次世代のタンパク質生産手段として期待される。本研究では、生体外タンパク質合成反応を活用した研究の中で明らかになってきた課題の解決により新たな生化学的知見の獲得と、同反応によるタンパク質生産の効率化に成功している。本研究の知見を要約すると以下の通りである。

(1)生体外タンパク質合成反応の特徴を活用した研究として、タンパク質合成反応におけるポリペプチドの高次構造形成機構解析を行い、リボソーム上での翻訳過程と共約して起きるポリペプチドの高次構造形成反応の終盤段階には、リボソーム上の Peptidyl tRNA からのポリペプチド遊離を分子シャペロンが促進する作用が関与していることを新たに示している。

(2)多数の変異体酵素の発現が簡便に行える生体外タンパク質合成反応の特徴を活用して、合成された変異導入タンパク質の評価を定量的に行うことで、同反応の酵素機能解析における有用性を示している。酵素の活性中心以外に数アミノ酸の欠損を有する変異型酵素を、生体外タンパク質合成反応で調製し、速度論的評価を行っている。その結果、これまで酵素機能への関与が不明であった、活性中心から立体配置上離れた領域のアミノ酸配列が、触媒反応に関係していることを明らかにしており、今後、他の酵素機能の解析への有用性を示している。

(3)生体外タンパク質合成反応の効率化の目的で、同反応の律速因子の解明を行い、回分式生体外タンパク質合成反応において、翻訳系および転写-翻訳カップリング系での律速因子を明らかにしている。次に、律速因子である NTP の連続供給によるタンパク質合成反応の持続によって、連続式生体外タンパク質合成反応によるタンパク質合成量の向上に成功している。

(4)生体外タンパク質合成反応の効率化技術の開発について述べている。まず、分子シャペロン画分の含有量を増加させた細胞抽出液を用いることで、合成タンパク質の比活性が上昇することを示し、回分式での活性タンパク質の回収率向上の手法を示している。次に、連続システムにおいて、低濃度の界面活性剤を用いることで、合成量が増加したことから、両手法を適用することで、生体外タンパク質合成反応の効率化による用途拡大の糸口を見出している。

以上のように、本研究では、バイオテクノロジー研究分野で重要な役割を果たす生体外タンパク質合成反応の活用によって、生化学的基礎的知見の拡充を図るとともに、次世代の工業的タンパク質合成手段としても有望な同反応の効率化に成功している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。