



Title	ランダムアミノ酸配列をもつポリペプチドからのDNA結合能をもつタンパク質の進化的創製
Author(s)	中島, 敏博
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48698
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	中島敏博
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第21655号
学位授与年月日	平成20年1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	ランダムアミノ酸配列をもつポリペプチドからのDNA結合能をもつタンパク質の進化的創製
論文審査委員	(主査) 教授 ト部 格 (副査) 教授 金谷 茂則 教授 小林 昭雄 教授 原島 俊浩 教授 福井 希一 教授 塩谷 捨明 教授 清水 浩 教授 仁平 卓也

論文内容の要旨

タンパク質の配列空間では、利用可能な20アミノ酸の異なる組合せにより非常に多くの配列が可能である。天然タンパク質はこの中のごく僅かな部分のみを構成するに過ぎず、多くの機能性タンパク質は未発見のままであると考えられる。ランダムなアミノ酸配列からDarwinが唱えた自然選択と変異からなる進化サイクルによって、機能性タンパク質が創成されたのであれば、タンパク質配列空間において実験的な時間的尺度の範囲内で任意の配列から出発して、人工進化により新規な機能性タンパク質を見出すことが可能であると考えられる。本研究では、これらの実験的検証のために、まずより広い配列空間を探索できる有力ツールとしてのランダムポリペプチド提示ファージライブラリーの構築とその性状の解析を行った。さらにそのライブラリーを用いたDNA結合タンパク質創成をモデルとした選択系の構築と進化サイクルにより、人工進化による機能性タンパク質創成の可能性を検証することを目的とした。

(1) ランダムポリペプチド提示ファージライブラリーの構築

Prijambada等の構築した95アミノ酸が20種類のアミノ酸を含むランダム領域を有する全長140アミノ酸からなるランダム配列から任意に選ばれた大腸菌で可溶性に発現する人工タンパク質25種を原始タンパク質として考え、これらの配列に変異を加えて多様性を発生させ、 2.1×10^6 種の多様性を有するファージディスプレイランダムポリペプチドライブラリーを構築した。このランダムタンパク質ライブラリーでは21.7%のクローンが実際に発現し、配列の多様性も有していた。この様な長いランダムポリペプチドを効率的に提示したファージライブラリーはこれまでに報告がなく、他の既知配列を持つタンパク質や酵素を提示したファージディスプレイシステムと同様に、このシステムがフォールディング能を有さない長いランダムポリペプチドにも適用できることを示した最初の例となった。

(2) ランダムポリペプチドライブラリーからのDNA結合タンパク質の進化的創成

最初に制限酵素認識部位を有する標的DNAを用いた効率的な人工進化選択システムを構築した。この選択システムでは適当な洗浄強度を組み合わせることにより、低くまた僅かな親和性の差しか有さないランダムポリペプチド配列でも制限酵素処理により標的DNAとの複合体の状態で回収できた。このシステムを用いた選択とランダム変異を第四世代まで繰り返した結果、標的DNAに対する結合能は世代毎に増加が認められ、第四世代目には優性な特定の配列への収束も観察された。

第四世代目に優性となった配列の先祖配列となったランダムポリペプチドはファージへの感染性への進化実験を検証した林等の報告と同じく全て RP3-42 であった。これらの結果は、RP3-42 が特殊な配列というのではなく（林等は任意に選択したに過ぎない）、同じランダムポリペプチドであっても適当な淘汰圧の下で、進化サイクルを経ることにより、様々な機能性タンパク質に進化できることを示していた。このことはタンパク質の進化が特殊な配列から選ばれたものではなく、より普遍的なものであることを示していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の配列空間では、利用可能な 20 アミノ酸の異なる組合せにより非常に多くの配列が可能である。天然タンパク質はこの中のごく僅かな部分のみを構成するに過ぎず、多くの機能性タンパク質は未発見のままであると考えられる。ランダムなアミノ酸配列から Darwin が唱えた自然選択と変異からなる進化サイクルによって、機能性タンパク質が創成されたのであれば、タンパク質配列空間において実験的な時間的尺度の範囲内で任意の配列から出発して、人工進化により新規な機能性タンパク質を見出すことが可能であると考えられる。本研究では、これらの実験的検証のために、まずより広い配列空間を探索できる有力ツールとしてのランダムポリペプチド提示ファージライブラリーの構築とその性状の解析を行っている。さらにそのライブラリーを用いた DNA 結合タンパク質創成をモデルとした選択系の構築と進化サイクルにより、人工進化による機能性タンパク質創成の可能性を検証することを目的としている。

(1) ランダムポリペプチド提示クアージライブラリーの構築

Prijambada 等の構築した 95 アミノ酸が 20 種類のアミノ酸を含むランダム領域を有する全長 140 アミノ酸からなるランダム配列から任意に選ばれた大腸菌で可溶性に発現する人工タンパク質 25 種を原始タンパク質として考え、これらの配列に変異を加えて多様性を発生させ、 2.1×10^6 種の多様性を有するファージディスプレイランダムポリペプチドライブラリーを構築している。このランダムタンパク質ライブラリーでは 21.7% のクローンが実際に発現し、配列の多様性も有している。この様な長いランダムポリペプチドを効率的に提示したファージライブラリーはこれまでに報告がなく、他の既知配列を持つタンパク質や酵素を提示したファージディスプレイシステムと同様に、このシステムがフォールディング能を有さない長いランダムポリペプチドにも適用できることを示した最初の例となっている。

(2) ランダムポリペプチドライブラリーからの DNA 結合タンパク質の進化的創成

最初に制限酵素認識部位を有する標的 DNA を用いた効率的な人工進化選択システムを構築している。この選択システムでは適当な洗浄強度を組み合わせることにより、低くまた僅かな親和性の差しか有さないランダムポリペプチド配列でも制限酵素処理により標的 DNA との複合体の状態で回収できている。このシステムを用いた選択とランダム変異を第四世代まで繰り返した結果、標的 DNA に対する結合能は世代毎に増加が認められ、第四世代目には優性な特定の配列への収束も観察されている。

第四世代目に優性となった配列の先祖配列となったランダムポリペプチドはファージへの感染性への進化実験を検証した林等の報告と同じく全て RP3-42 である。これらの結果は、RP3-42 が特殊な配列というのではなく（林等は任意に選択したに過ぎない）、同じランダムポリペプチドであっても適当な淘汰圧の下で、進化サイクルを経ることにより、様々な機能性タンパク質に進化できることを示していた。このことはタンパク質の進化が特殊な配列から選ばれたものではなく、より普遍的なものであることを示していると考えられる。

以上のように、本論文は人工進化による機能性タンパク質創成の可能性を明らかにしたものであり、本分野の発展に大きく貢献している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。