



Title	再構成無細胞翻訳系を用いたリボソームディスプレイ法によるタンパク質試験管内進化
Author(s)	柳田, 勇人
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57737
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

変異と選択からなる進化のメカニズムを模倣し、タンパク質を実験室内で人工的に進化させる進化工学的手法は、タンパク質進化のプロセスを観察するといった基礎研究や、新規機能性タンパク質の創出などのために広く用いられている。タンパク質の進化工学的手法は主に、目的タンパク質の遺伝子ライブラリの作製、タンパク質への翻訳、目的の形質を持つタンパク質の選択、選択したタンパク質の遺伝子の増幅の段階からなる。タンパク質の取り得る膨大な数のアミノ酸配列から、目的の形質を持つ配列を効率的に選択するためには、多数のアミノ酸配列を偏りなく探索することは重要である。進化工学的手法のうち、生細胞を用いない試験管内進化系は、生細胞を用いるものと比べて原理的により多数のアミノ酸配列を探索できる。一方で、従来の試験管内進化系で用いられてきた無細胞翻訳は細胞粗抽出液を用いているために、翻訳阻害因子を含むなどの理由からアミノ酸配列の探索範囲が限定される。そこで、本研究では、従来よりも多数のアミノ酸配列を偏りなく探索可能な試験管内進化系を新規に確立し、これを保存残基への有害変異を受けたタンパク質の補償的進化に関する研究、および新規機能性タンパク質の創出に利用することを目的とした。

まず、タンパク質翻訳反応に必須な因子のみを単離精製し、これを試験管内で再構成した無細胞翻訳系(PURE system)を用いた試験管内進化系を構築した。これにより、従来法より実験条件に制限のない、かつ多数のアミノ酸配列を高速で探索する実験系を確立した。具体的には、PURE systemを用いたリボソームディスプレイ(RD)法を確立した。ヌクレアーゼやプロテアーゼなどの翻訳阻害因子を含まないPURE systemを用いることで、従来の大腸菌S30画分と比べてRD法の遺伝子回収効率は10倍以上向上し、さらに4℃に限定されていた選択条件は50℃まで可能であることを示した。以上より、翻訳阻害因子の影響を受けにくく、より広範な温度条件下で、迅速にタンパク質進化実験が可能となった。

次に、同RD法を用いた基礎研究として、タンパク質進化の重要な局面の一つである、保存残基が置換されたタンパク質変異体の補償的進化について調べた。モデルタンパク質としてhYAP WWドメインを用い、ファミリー内で厳格に保存されたアミノ酸残基を置換し、立体構造が破壊され機能が低下したW17F変異体の進化能について調べた。4回の選択サイクルの結果、2, 3個の他の変異により、野生型以上の特異的な機能が復帰し、アンフォールドしていた構造は、二次構造が誘起されコンパクトになることがわかった。つまり、タンパク質の保存残基に対して有害変異が起こったとしても、他の少数の変異で補償的な進化が起こりうることを示している。このような補償的な進化能は、保存残基の置換により新しいファミリーが生まれる進化過程(分岐進化)において重要であったと考えられる。

最後に、同RD法を用いた応用研究として、低分子化合物と共有結合を形成するラベリングタグとして応用可能な新規機能性タンパク質を迅速に創出できることを示した。具体的には、WWドメインを出発配列として、SS結合を介してペプチドをビオチンラベルしたリガンドへの結合能を進化させた。その結果、ビオチンと、リガンドのペプチド配列特異的にSS結合を形成するWWドメインのCys変異体が得られた。このようなポリペプチドタグを迅速に創出するための進化的な方法論は、用途に合わせた様々なタグ配列を創るためのツールとして有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、再構成型の無細胞翻訳系を用いて、試験管内進化系であるリボソームディスプレイ法の改良を行った。その結果、従来法よりも遥かに大きなライブラリーサイズを高速に扱うことの可能な試験管内進化系を実現した。この方法により、保存アミノ酸を置換したタンパク質の補償的進化の観察と、新規機能性タンパク質の創出という、2つのテーマについての研究を行った。具体的には、あるタンパク質の高度に保存されたアミノ酸の置換により低下した機能や不安定化した構造を、他の少数の変異で補償できるということを実験的に示した。また、同法により、共有結合ラベリングタグとし

【172】

氏 名	やなぎ だ ほう と 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 9 5 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	再構成無細胞翻訳系を用いたリボソームディスプレイ法によるタンパク質試験管内進化
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 四 方 哲 也 (副査) 教 授 難 波 啓 一 教 授 倉 光 成 紀

て応用可能なタンパク質変異体を迅速に取得できることを示した。以上の成果により、タンパク質進化の基礎研究からその応用に至る広い分野で、再構成無細胞翻訳系を用いたこの新規リボソームディスプレイ法の有用性を実証した。

これらの成果はすでに2報の原著論文に採択されており、また3件の国際会議および3件の国内会議で発表されている。

以上より、申請者は博士（工学）に値するものと認める。