The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	膜タンパク質機能改変技術のための基盤技術の開発に関する研究
Author(s)	曽我, 遥
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61772
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　曽我　遥　　）	
論文題名	膜タンパク質機能改変技術のための基盤技術の開発に関する研究

論文内容の要旨

進化分子工学とは、遺伝子の変異とコードされたタンパク質の機能による選択のステップを繰り返し行うことで、実験室内でタンパク質を改変・改良する技術である。創薬・化学等の産業分野で用いられる可溶性タンパク質（酵素・抗体など）の多くは、用途に合わせて性質を改良された変異体が用いられている。これらの変異体の創出には、進化分子工学が大いに貢献してきた。

膜タンパク質は、細胞内外の物質輸送やシグナル伝達など、生命を維持するために重要な役割を果たしている。また、創薬のターゲットの約5割が膜タンパク質をターゲットとしており、産業の面でも注目されている。しかしながら、膜タンパク質は、一般的に疎水性が高く、細胞を用いて調製することが困難であるという性質を持つ。そのため、少数の例は近年報告されているものの、進化分子工学のターゲットとして扱われてこなかった。

そこで本研究では、膜タンパク質を扱う進化分子工学的手法の開発を目的とし、その基盤技術の開発を行った。

第1章　序論

第1章では、まず進化分子工学の概略とその発展の歴史について述べた。次に、膜タンパク質と本研究おけるモデルタンパク質が属するトランスポーターについての概略を述べた後に、本研究で用いた多剤排出トランスポーターEmrEについての概略を記述した。本章の最後に本研究の目的を記述した。

第2章　GUV内部膜タンパク質合成

無細胞翻訳系は膜タンパク質調製の有効なツールとして用いられてきた。無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質の調製では、反応系への界面活性剤の添加や、脂質二重膜を供する事で膜タンパク質を安定化する方法が採られる。本研究では、後に進化分子工学に応用するために、細胞サイズのリン脂質二重膜(リポソーム、Giant Unilamellar Vesicle; GUV)内部で合成を行った。リポソーム内部合成を用いた膜タンパク質合成では、これまでに膜タンパク質の主要なクラスを占めるトランスポーターについては行われていなかった。そこで本研究では、多剤排出トランスポーターEmrEのGUV内部合成を行った。その結果、GUV内部で合成されたEmrEは輸送機能を保った状態で、GUV膜に挿入されていることが明らかとなった。また、ベシクル体積とEmrEのGUV膜への膜挿入効率の関係を見出した。さらに、EmrEのGUV膜への自発的膜挿入を説明しうる数理モデルを構築した。

第3章　トランスポーターに対するLiposome display法の適用

Liposome display法は、GUV内部で合成された膜タンパク質を介してGUV内部に取り込まれた蛍光基質の蛍光強度を指標に、セルソーター(FACS)を用いて高機能型の変異体をセレクションする手法である。Liposome display法によるタンパク質の機能改変の例は、現在、水溶性の特殊な膜タンパク質に限られている。第3章では、既存技術であるLiposome display法を、一般的な疎水性の膜タンパク質であるEmrEに応用するための実験条件を確立した。

第4章　バイオパニングを用いたLiposome display法の開発

バイオパニングを用いたLiposome display法では、基質とのアフィニティを利用して、膜タンパク質を呈示しているGUVのセレクションを行う。第3章で述べたFACSによるLiposome display法では、蛍光基質を持つ膜タンパク質の機能改変に限られるが、バイオパニングを用いることで蛍光基質を持たない膜タンパク質の機能改変を行うことが可能となる。第4章では、磁性ビーズを用いて異なる種類の膜タンパク質呈示するリポソームの混合液から、目的の膜タンパク質を呈示するリポソームをセレクションするための実験操作や実験条件を確立した。

第5章　総括

本研究では、膜タンパク質をターゲットとする進化分子工学的手法の開発を目的として、その基盤技術を確立した。無細胞翻訳系による膜タンパク質の調製方法は、非常に拡張性が高い。よって今後、大腸菌由来の膜タンパク質に止まらず、哺乳類由来の膜タンパク質等、広範な膜タンパク質の機能改変への応用が期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　曽　我　遥　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	（教授）	渡邉　肇
	副 査	（教授）	藤山　和仁
	副 査	（教授）	大政　健史
	副 査		
	副 査		
	副 査		
	副 査		

論文審査の結果の要旨

本論文は膜タンパク質を扱う進化分子工学的手法の開発を目的とし、その基盤技術の開発を行った研究をまとめたものであり、得られた主な成果を要約すると以下の通りである。

（１）細胞サイズのリン脂質二重膜(リポソーム、Giant Unilamellar Vesicle; GUV)内部で無細胞翻訳系を用いた膜タンパク質合成を行った。多剤排出トランスポーターEmrE の GUV 内部合成を行った結果、GUV 内部で合成された EmrE は輸送機能を保った状態で、GUV 膜に挿入されていることを示し、ベシクル体積と EmrE の GUV 膜への膜挿入効率の関係を見出した。また GUV 膜への自発的膜挿入を説明しうる数理モデルを構築した。

（２）GUV 内部に取り込まれた蛍光基質の蛍光強度を指標に、セルソーター(FACS)を用いて高機能型の変異体をセレクションする Liposome display 法を応用し、一般的な疎水性の膜タンパク質である EmrE に適用するための実験条件を確立した。

（３）基質とのアフィニティを利用して、目的タンパク質を呈示している GUV の選択を行うバイオパニングの手法を開発した。磁性ビーズを用いて異なる種類の膜タンパク質呈示するリポソームの混合液から、目的の膜タンパク質を呈示するリポソームを選択するための実験操作や実験条件を確立した。

以上のように本論文では、生体内の重要な構成成分であるにもかかわらず従来は非常にアプローチが困難であった膜タンパク質をターゲットとして、進化分子工学的手法の開発を行いその基盤技術を確立しており、今後の膜タンパク質研究と新奇膜タンパク質の創製に大きく寄与するものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。