

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	トリプファンを含まない遺伝暗号表およびタンパク質 の進化に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	河原晃大
Author(English)	Akio Kawahara
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9682号, 授与年月日:2014年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木質 大介,山村 雅幸,中村 清彦,木川 隆則,瀧ノ上 正浩
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9682号, Conferred date:2014/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	河原 (小林) 晃大
(要 旨) 触媒など、生命における反応をつかさどるタンパク質の構成要素であるアミノ酸は、現在では20種類であるが、進化の初期においては7-13種類であったと考えられている。生命の起源と進化に関する研究が、単純なものから複雑なものへとシステムが発展していくことを明らかにしてきた事実に符合するように、タンパク質を構成するアミノ酸セットの種類は、細胞の成立後、アミノ酸やタンパク質の生合成経路の発達によって徐々に増加したと考えられている。このタンパク質の世界と、DNAやRNAの核酸の世界をつないで進化を可能にするのは、遺伝暗号表である。20種類のアミノ酸セットからなる普遍遺伝暗号表は、19種類以下のアミノ酸セットからなる単純な形から進化してきたと考えられている。普遍遺伝暗号表の成立のひとつ前の時代の遺伝暗号表では、トリプトファン(Trp)以外の19種類アミノ酸セットで諸タンパク質の機能が達成され生命が成立していたと考えられる。本研究では以下の2つ、すなわち①Trp以外の19アミノ酸からなるセットでもタンパク質の進化が可能であること、②Trpが含まれない遺伝暗号表が成立すること、を「創る」アプローチを用いて実験的に示すことで、過去にTrpが含まれない遺伝暗号表をもとにタンパク質が機能・進化し、生命現象を支え得たとする実験的事実を提供する。本論文は四章で構成され、序章では上記の導入を、第二章、第三章では実験の結果と考察を、第四章では総合討論を記述した。 第二章では、Trpを含まない19種類のアミノ酸セットからなるタンパク質の人工進化について記述した。Trpが遺伝暗号表に導入される前に存在したと考えられている19種類のアミノ酸からなるタンパク質が進化できたであろうことは、Trpを含まない野生型タンパク質の人工進化によって確認されている。しかし、Trpを含まない野生型タンパク質は稀であり、人工進化の知見を蓄積するためには進化実験の対象を広げる必要がある。私は、20種類のアミノ酸からなる緑色蛍光タンパク質に含まれるTrpを置換し、変異と選択を繰り返すDirected evolutionを用いることで、Trpを含まない19種類のアミノ酸セットからなるタンパク質の活性が向上することを示した。さらに、活性を向上させる複数の変異はそれぞれが加算的に活性を向上させることも明らかにし、従来知られていた20種類のアミノ酸セットからなるタンパク質の人工進化との類似性を示した。 第三章では、Trpを含まない19種類のアミノ酸セットからなる遺伝暗号表の構築について記述した。Trpを含まない19種類以下のアミノ酸セットからなる遺伝暗号表は、進化の途上で存在したと考えられているが、今のところ現存するものは見つかっておらず、また実験的に構築可能かどうかは確かめられていなかった。私は、Trpを含まない19種類以下のアミノ酸セットからなる遺伝暗号表を構築するために、大腸菌由来の無細胞翻訳系に対して、①反応系中からTrpを除き、②TrpをトリプトファンtRNAに結合させるトリプトファンtRNA合成酵素の活性を阻害し、かつ③Trpコドンに対応するアンチコド				

ンを持つアラニルtRNA変異体を加える、の3つの改変を加え、その後の機能解析に進んだ。解析の結果、構築した遺伝暗号表はどのような遺伝子配列に対してもTrpを含むことのないものであることを確認できただけでなく、タンパク質翻訳の効率と正確性が通常の遺伝暗号表と同等であることも確認できた。さらに、同様の構築概念を用いて、どのような遺伝子配列に対してもシステインを含むことのない遺伝暗号表も構築できることを示した。

第四章では、第二章と第三章で得られた結果を総合し、Trpが遺伝暗号表に導入された意義について仮説を立てて考察した。Trpは、特別な触媒反応を提供する反応基を持たず、かつ生合成のためのエネルギーコストが20種類のアミノ酸の中で最大であるため、遺伝暗号表に積極的に取り入れられる理由が少ない。しかし、20種類のアミノ酸の中で最大のファンデルワールス半径を持つ疎水性アミノ酸として、Trpはタンパク質の疎水性コアを効率的に埋める役割を担ったために、遺伝暗号表に取り入れられたとする仮説を提唱した。展望として、本研究で構築したTrpを含まない遺伝暗号表とDirected evolutionを組み合わせることで、Trpを含まない活性型タンパク質を効率的に取得でき、進化の途上で存在したTrpを含まないタンパク質の特徴についての考察を深める有用な手段となることを提示した。最後に、同様にTrpを含まない遺伝暗号表とタンパク質についての理解を深めるために重要な課題である、Trpを含まない生物の創出に向けた提案を行い、本研究の締めとした。

(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	河原 (小林) 晃大
(要 旨) At earlier stages before the completion of the universal genetic code, the genetic code and protein are considered to have been composed of 19 canonical amino acids without tryptophan (Trp). Although this notion is supported by a wide range of data, the actual existence of the simplified protein synthesis system has not been addressed experimentally. Here, I conducted the experimental protein evolution and construction of an artificial genetic code with the 19 amino acids without Trp. On the protein evolution experiment, I created active Trp-less green fluorescent proteins (GFPs) from a Trp-less poorly fluorescent mutant, S1-W57F, by using directed evolution with two rounds of random mutagenesis and selection. The N105I and S205T mutations showed beneficial effects on the S1-W57F mutant. When these two mutations were combined on S1-W57F, we observed an additive effect on the fluorescence intensity. In contrast, these mutations hardly showed beneficial effects individually or in combination on GFPS1, which is the parental GFP mutant composed of 20 amino acids. On the construction of the artificial genetic code, which I named the “simplified genetic code”, a tRNA^{Ala} variant with the Trp anticodon reassigns alanine to an unassigned UGG codon in the <i>Escherichia coli</i> S30 cell-free translation system lacking Trp. I confirmed that the efficiency and accuracy of protein synthesis by this Trp-lacking code were comparable to those by the universal genetic code, by an amino acid composition analysis, GFP fluorescence measurements and the crystal structure determination. I have also shown the generality of the method for the simplification, by constructing another type of simplified code lacking Cys. The lines of experimental results will provide new insights into early stage of protein evolution and genetic code. Based on those results, I will hypothesize the reason why Trp is introduced in the genetic code. Finally, I will discuss the roadmap for the creation a Trp-less organism for further understanding of Trp-less protein era.				