

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ミスアシル化tRNAによるPEG修飾および光応答性ペプチドアプタマーのin vitroセレクション
Title(English)	Misacylated tRNA for PEGylation and in vitro selection of photo-responsive peptide aptamer
著者(和文)	ZangQingmin
Author(English)	Qingmin Zang
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10007号, 授与年月日:2015年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,小長谷 明彦,伊藤 嘉浩,木賀 大介,瀧ノ上 正浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10007号, Conferred date:2015/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	Zang Qingmin	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	山村 雅幸	教授	伊藤 嘉浩	連携教授
	審査員	小長谷 明彦	教授		
		木賀 大介	准教授		
	瀧ノ上 正浩	准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

1970 年代に発見された制限酵素を用いて生まれた遺伝子組換え技術により、アミノ酸配列を自由に設計できるタンパク質工学が生みだされた。そして、1990 年前後には、非天然アミノ酸を遺伝子工学的にタンパク質に導入することも可能になり、これとは別にランダム配列のアミノ酸や核酸配列から結合性分子を得る進化分子工学も生まれた。近年になって、非天然アミノ酸として合成高分子を導入したり、非天然アミノ酸を進化分子工学に組み入れたりする研究がようやく可能になってきた。本論文は、複数種類の合成高分子を部位特異的にタンパク質に導入することと、光応答性の官能基を導入したアミノ酸を用いる進化分子工学で光応答性のペプチドアプタマーを調製できることを明らかにしたもので、“Misacylated tRNA for PEGylation and in vitro selection of photo-responsive peptide aptamer” と題し、英文 4 章からなる。

CHAPTER 1 “GENERAL INTRODUCTION” では、非天然アミノ酸をペプチドやタンパク質に導入する技術についてまとめている。まず化学的な手法として古典的な化学修飾法、固相合成法、化学ライゲーシオン法を併用した半合成法をまとめている。次に、生化学的なアプローチとして、無細胞翻訳系を使って tRNA に非天然アミノ酸を担持させて遺伝暗号を使って導入する方法を論じている。その中では、tRNA に非天然アミノ酸を担持する方法として、アミノアシル tRNA 合成酵素を用いる酵素法、有機合成手法とリガーゼを用いる酵素法を組み合わせた半合成法、そして RNA 酵素を用いる方法を概説している。また、非天然アミノ酸に対応するコドンとして、終止コドンを用いる方法とフレームシフトを起こす四塩基コドンを用いる方法を述べている。

次に、これらの手法を用いたタンパク質工学の例として、酵素のターンオーバーの向上、耐熱性の向上、医薬品酵素としての応用、プローブとしての利用、抗体医薬としての応用、新しい材料としての応用などが列挙され、それぞれの特質について論じた上で、CHAPTER 2 以下の構成を紹介している。

CHAPTER 2 “IN VITRO TRANSLATION OF TWO PEGS WITH DIFFERENT LENGTHS INTO ONE POLYPEPTIDE BACKBONE” では、両親媒性合成高分子で、免疫原性の低減のために用いられているポリエチレングリコール (PEG) を、ペプチドの指定した複数部位へ特異的に導入することが無細胞翻訳系を用いて行われている。これまでに同様な実験は報告されているものの、この方法の最大の特徴となる複数の長さの異なる PEG を特定の部位に導入した例は報告されていなかったと述べている。本論文では、その実現が初めて報告されたと論じている。非天然アミノ酸に対応するコドンとして、終止コドンの UAG とフレームシフトを起こす四塩基コドン CGGG を使い、長さの異なる PEG (分子量 170 と 340) を導入できることを明らかにしている。

無細胞翻訳系では、一般に DNA にコードされた遺伝暗号に従い mRNA が合成され、これをリボソームが認識して対応する tRNA が結合してアミノ酸からのペプチド合成が開始される。本論文では PEG 鎖は、アミノフェニルアラニンを介して tRNA へ担持される。PEG 鎖が長い (分子量が 170, 340, 510, 1040 と高くなる) ほど、ペプチドへの導入効率は低下することがわかったとしている。また、2 箇所同時に特異的に導入する場合、1 箇所だけの場合と比べて翻訳効率は著しく低下するものの導入できることを、マスペクトル測定により確認できたと述べている。

CHAPTER 3 “IN VITRO SELECTION OF A PHOTO-RESPONSIVE PEPTIDE APTAMER TO GLUTATHIONE-IMMOBILIZED MICROBEADS” では、非天然アミノ酸を進化分子工学系に導入している。光異性化能のあるアゾベンゼンを結合したアミノフェニルアラニンを、有機合成と酵素法を組み合わせた半合成法で tRNA に担持し、リボソーム・ディスプレイを用いる進化分子工学過程に導入している。ランダム配列

の DNA 鋳型の特定位置に終止コドンを挿入し、転写、翻訳することでアゾベンゼンの挿入されたペプチド・ライブラリーを作り、その中から可視光照射下でグルタチオン固定化ビーズに結合し、紫外光照射下で解離するペプチドを選別している。8 回の進化分子工学の選別工程ののち、得られたペプチド配列から重複のある 2 配列を固相法で合成し、解離定数を求めると、数マイクロモル濃度程度であったと述べている。

可視光照射下と紫外光照射下で合成したペプチド誘導体の紫外線吸収を調べると、アゾベンゼンのシス・トランス異性化により 2 つのペプチドとも変化が見られたとしている。さらに、ターゲットのグルタチオン固定化ビーズへの結合を測定すると、2 つのペプチドのうち 1 つが異性化により有意に結合・解離することが観測されたとしている。このようにして、光に応答してターゲットに結合したり解離したりできるペプチドの作成に成功することができたと述べている。従来、任意のターゲットに対してこのように刺激に応答して結合・解離する分子を合成することは困難であったが、進化分子工学を用いることで可能になったと論じている。

CHAPTER 4 “CONCLUSIONS” では、CHAPTER 1 から 3 までの内容をまとめた上で、今後の展望について論じている。

以上を要するに、本論文は、非天然アミノ酸を担持した tRNA を用いて、精密な合成高分子-タンパク質複合体の合成を可能にすること、および任意のターゲットに対して機能性ペプチドを探索可能にすることを明らかにしたもので、将来医薬品を含む様々な機能性分子の設計に役立つことが期待され、工学上貢献するところが大きい。よって博士（工学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。