

氏名	濱田 浩幸
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3151号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Position-Specific Incorporation of Fluorescent Amino Acids into Proteins for Fluorescence Sensing (蛍光性アミノ酸を位置特異的に導入した蛋白質の創製と その蛍光センシングへの応用)
論文審査委員	教授 宍戸 昌彦 教授 山田 秀徳 教授 中西 一弘

#### 学位論文内容の要旨

機能性側鎖を有する非天然アミノ酸の蛋白質への導入は、その人工機能を蛋白質に直接付与することができ、蛋白質の新たな応用を進める上で有用な手法である。しかしながら、目的の機能化を達成するためには、非天然アミノ酸を蛋白質の適切な位置へ導入する必要がある。

本研究室では化学的アミノアシル化と4塩基コドンを用いたコドンの拡張によって非天然アミノ酸を特定位置に導入した蛋白質を遺伝子工学的に作製することに成功している。この手法は、非天然アミノ酸の人工機能を蛋白質に直接付与することができ、量的および網羅的な導入が可能になる。さらに蛋白質の構造機能解析や分子の挙動など蛋白質の新たな応用を進める上で有用な手法になると期待される。本論文では非天然アミノ酸を位置特異的に導入した非天然蛋白質を用いてバイオセンシング法や蛋白質機能解析法の開発を行った。

まず第2章では抗原抗体反応による標的分子の認識をリアルタイムに検出できるよう環境感受性を持つダンシル基を側鎖に持つ非天然アミノ酸(2,6-dansylaminophenylalanine)を位置特異的に導入した変異抗体の設計・合成し、標的抗原であるリゾチームの高感度センシングを行った。

3章では光安定性に優れ、分子サイズが比較的小さく、大腸菌生合成系において高効率で蛋白質へ導入される新規蛍光性非天然アミノ酸 acridonylalanine(acdAla)を位置特異的に導入した非天然蛋白質を用いて、ターゲット分子の高感度センシングを行った。

さらに4章では蛍光標識アミノ酸の蛋白質への導入技術をもとに、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)のドナー(acdAla)とアクセプター(BODIPY)となる2種類の蛍光プローブを用いてEFTuとGDPあるいはGTPの結合におけるEFTuの機能解析を行った。

本論文では非天然アミノ酸を位置特異的に導入した非天然蛋白質を用いてバイオセンシング法や蛋白質機能解析法を確立した。この手法の確立は、予防医療の実現や画期的な新薬の開発に非常に大きな貢献が期待される。

## 論文審査結果の要旨

本論文ではいくつかの新規蛍光性非天然アミノ酸を蛋白質の特定の位置に導入する方法を開発している。またその手法を用いて、蛍光性アミノ酸を抗体あるいは酵素に導入し、抗原あるいは基質の極微量検出、あるいは蛋白質のコンホメーション変化の検出に成功している。第1章の序文に続く第2章では抗体にダンシル蛍光基をもつアミノ酸を導入して、nMオーダーの抗体検出が可能であることを示している。また第3章では抗体やの受容体に新規蛍光性アミノ酸であるアクリドニルアラニンを導入することによりnMからpMレベルの抗原やリガンドの検出が認められている。さらに第4章ではアミノアシル化されたtRNAと結合するEF-Tuにアクリドニルアラニンを導入し、さらにEF-TuにBODIPYFL導入GTPを結合させることにより、分子内FRETによるEF-Tuのコンホメーション変化の検出にも成功している。これらの結果は蛍光性アミノ酸導入蛋白質が敏感なバイオセンシングデバイスとしての実用レベルに達していることを明らかにしており、工学的に興味深く、また独創性の高い研究であると評価される。以上の結果より、本論文は博士(工学)に十分値するものと判定される。