

論文審査の要旨および学識確認結果

報告番号	①／乙第 号	氏 名	Seaim Lwin Aye
論文審査担当者：	主査	慶應義塾大学教授	博士（地球環境科学） 土居 信英
	副査	慶應義塾大学教授	工学博士 岡 浩太郎
		慶應義塾大学教授	博士（理学） 宮本 憲二
		慶應義塾大学准教授	博士（工学） 古川 良明
(論文審査の要旨)			
<p>学士（工学）、修士（工学） Seaim Lwin Aye 君提出の学位請求論文は、「Compartmentalized replication for directed evolution of DNA polymerase and transcriptional regulator (区画化複製法による DNA ポリメラーゼおよび転写制御因子の定向進化)」と題し、全4章から成っている。</p> <p>区画化複製法は、タンパク質の進化工学の手法の1つであり、転写翻訳に関連する特殊な酵素や制御因子などのタンパク質に適用される。これらのタンパク質の機能をモニターするためのレポーター遺伝子として耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いることで、水/油型エマルジョンの区画中での PCR により高い機能をもつ変異体遺伝子を選択的に増幅し、実験室内（定向）進化させることができる。しかし、これまで区画化複製法で使用されていた <i>Taq</i> DNA ポリメラーゼはこのエマルジョン PCR に最適化されておらず、実際に区画化複製法を適用して定向進化することができたタンパク質の種類はごくわずかであった。そこで本論文では、区画化複製法に適した DNA ポリメラーゼ変異体を作製し、改良した区画化複製法をヒ素に対するセンサータンパク質の改良に応用した。</p> <p>第1章は序論であり、区画化複製法の従来の問題点およびその解決策について概説し、本研究の目的と意義を示している。</p> <p>第2章では、耐熱性 DNA ポリメラーゼを合理的デザインおよび進化工学により改良した結果について記述している。まず、<i>Tth</i> DNA ポリメラーゼを配列空間中の新たな出発点として、(i) N 末の 5'-3'エキソヌクレアーゼドメインの代わりに DNA 結合ドメイン Sso7d を融合し、(ii) 他の酵素で個別に報告されていた既知の変異を4つ導入し、(iii) 大腸菌のコドン使用頻度に最適化することで、複製の正確性を維持したままエマルジョン PCR の増幅性が向上した改変体を得ることができた。さらに作成した改変体遺伝子にさらにランダム変異を導入して区画化複製法による定向進化をおこなった結果、元の酵素よりも少ないサイクル数で、DNA 遺伝子断片をエマルジョン中で効率よく増幅できる変異体酵素を取得することに成功した。</p> <p>第3章では、改良した区画化複製法をヒ素に対するセンサータンパク質の定向進化に応用するために、ヒ素応答性転写制御因子 <i>ArsR</i> の2段階定向進化実験系を開発した結果について記述している。現在、アジア、南米、および、アフリカ地域の数千万人以上の人々の飲料水がヒ素に汚染されていると言われており、水が飲用可能かどうかを簡便かつ安価に検査できるヒ素に対するバイオセンサーの開発が求められている。そこで、まず、<i>ArsR</i> がヒ素存在下で GFP 発現を誘導する大腸菌センサーを構築し、その感度や安定性、特異性を解析した。次に、第2章で作製した <i>Tth</i> DNA ポリメラーゼ改変体をレポーターとした区画化複製法を用いて、より低濃度のヒ素に応答する高感度な <i>ArsR</i> を定向進化させるための「ON 選択系」を構築した。さらに、この ON 選択系だけでは、<i>ArsR</i> の機能を失った変異体も偽陽性として選択されてしまうため、ヒ素が存在しないときには、<i>ArsR</i> の抑制活性が維持されている遺伝子を選択するために、レポーターとして自殺遺伝子 <i>SacB</i> を組み込んだ「OFF 選択系」を構築し、2段階の ON/OFF 選択系の作動を確認した。</p> <p>第4章では、総括として全体のまとめと今後解決すべき課題、および本研究の将来的な応用について記述している。</p> <p>以上、本論文では、区画化複製法に適した耐熱性 DNA ポリメラーゼ変異体を創出し、この新しいレポーターを利用した区画化複製法を応用してヒ素応答性転写制御因子のスクリーニング系の開発を行なった。本論文で開発した手法は、様々な転写制御因子や遺伝子回路の定向進化に応用可能であり、タンパク質工学や合成生物学分野における発展性がきわめて高い。</p> <p>よって、本論文の著者は博士(工学)の学位を受ける資格があるものと認める。</p>			
学識確認結果	<p>学位請求論文を中心にして関連学術について上記審査会委員で試問を行い、当該学術に関し広く深い学識を有することを確認した。</p> <p>また、語学（英語）についても十分な学力を有することを確認した。</p>		