

氏名(本籍)	にしむらくにひろ 西村訓弘(三重県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博乙第1,139号
学位授与年月日	平成7年12月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	生体外蛋白質合成の効率化に関する研究
主査	筑波大学教授 工学博士 向高祐邦
副査	筑波大学教授 工学博士 松村正利
副査	筑波大学教授 農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学教授 理学博士 山根國男

## 論文の要旨

蛋白質は食品をはじめ、反応触媒としての酵素、バイオチップの素子、さらには抗体として重要な素材であり、その工業的生産技術の開発が期待されていることから、本研究では、生物の持つ優れた蛋白質合成系を利用し、かつ天然型、非天然型いずれの蛋白質の合成も可能であると考えられる生体外蛋白質生産方法について、目的蛋白質のみを選択的に、またより多く安定的に生産するための検討を行った。その具体的な例として、クロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ (CAT) を目的蛋白質とし、本酵素を生産する遺伝子を導入した大腸菌の細胞抽出液を蛋白質合成系として利用した。

まず、生体外蛋白質合成法の効率化を評価する上での標準として利用するために、Zubay 法を基本とする回分反応法の確立と Spirin らの提唱した基質及びエネルギー源を連続的に供給する連続法の追試を行った。この結果、連続法では気泡の混入を防ぐように改良した試作チェンバーを用いることで、同時に行った回分反応法の約9倍に相当する9000ユニット程度の合成が達成され、連続法の有効性が確認できた。

次に、従来法による生体外蛋白質合成では、目的蛋白質以外の不要な蛋白質も合成されることから、目的蛋白質のみの選択的合成法の構築を試みた。T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌株細胞 *E. coli* BL 21 (DE 3) から T7 RNA ポリメラーゼ含有細胞抽出液を調整し、T7 プロモーター制御蛋白質遺伝子を含む鋳型 DNA と組み合わせ、併せて大腸菌 RNA ポリメラーゼの働きをリファンピシンで阻害することで、目的蛋白質のみを選択的に合成する生体外蛋白質合成法が構築できた。このことによって、外来遺伝子発現により新たな機能を付加した大腸菌から細胞抽出液を調整し、蛋白質合成の触媒として利用することで、生体外蛋白質合成法の機能拡大が図れることを示した。

さらに、内因性遺伝子の過剰発現を利用して蛋白質合成系の効率化を図るため、分子シャペロンを高濃度で含む細胞抽出液を利用した高比活性型酵素蛋白質の合成を検討した。CAT 蛋白質は4量体であり、合成蛋白質が活性を発現するためには4量体としてのフォールディングが必要となることから、フォールディングに強く関係する分子シャペロンを大腸菌の熱ショックにより増やし、この分子シャペロンを高濃度で含む細胞抽出液を利用することでフォールディング活性の高い生体外蛋白質合成系が構築できることが明らかとなった。このことより、内因性遺伝子の過剰発現を利用した細胞抽出液の特定機能の増強が生体外蛋白質合成の効率化に対して有効な手法となることを示した。

遺伝子発現を利用した細胞抽出液の改良に伴って細胞抽出液中の RNA 分解活性が著しく上昇し、反応が持続しないことが大きな問題となったが、蛋白質合成には影響せず、RNA 分解酵素活性のみを阻害する方法として、0.5 mM の銅イオンの添加が有効であることが明らかとなり、これより、遺伝子発現を利用した大腸菌細胞抽出液の改良効果が最大限に引き出せることを示した。

このように、本研究では、遺伝子発現を利用した大腸菌の改良によって、また、その改良によって生じる負の影響に対する具体的対策を施すことによって、生体外蛋白質合成法の効率化が図れることを実証した。

## 審 査 の 要 旨

本論文では、多くの分野で重要な素材としてその生産が期待されている蛋白質の工業的生産技術の開発を目的として、より汎用性のある生体外蛋白質合成法が検討され、本方法における蛋白質合成の効率化に関する種々の有用な手法が提示されている。蛋白質の生産方法としては、微生物や動植物細胞をそのまま用いる方法もあるが、このような方法では生産できる蛋白質が天然型のものに限定されるので、天然型のみならず人工設計した新機能蛋白質合成も可能な生産方法として、最近、細胞由来の蛋白質合成系を生体外で働かせることを原理とする生体外蛋白質合成法が注目されてきている。しかし、まだ目的蛋白質のみを選択的に合成できるまでには至っておらず、これを本論文では、これまでのこの生体外蛋白質合成法をさらに改良し、目的の蛋白質のみを選択的に生産する方法を確立した上で、さらに高比活性型の蛋白質の生産力を高め、併せてこの蛋白質生産系をより安定に保つための方策を施すことによって、生体外蛋白質合成法の効率化を図っている。本論文で示された種々の知見は、実用的にも学術的にも高く評価され、生化学工業の今後の発展に貢献するものである。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。