

氏名（本籍） 蔡 维艳（維艶） （ 中国 ）

学位の種類 博 士（ 生物工学 ）

学位記番号 博 甲 第 6743 号

学位授与年月日 平成26年 1月31日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

審査研究科 生命環境科学研究科

学位論文題目

Utilization of Random Peptide Library with Natural Neurotoxin Scaffold and Development of Directed-evolution Technologies
(天然神経毒構造に基づくランダムペプチドライブラリーの作製と分子進化工学技術の開発)

主査 筑波大学教授（連携大学院） 医学博士 石田 直理雄

副査 筑波大学教授 農学博士 深水 昭吉

副査 筑波大学教授 農学博士 宮崎 均

副査 筑波大学名誉教授 農学博士 内山 裕夫

論 文 の 要 旨

指向的進化技術は、特定のタンパク質のアミノ酸配列や長さを人為的に改変し、標的分子に対する特異性や親和性、タンパク質自体の化学的安定性等について所望の特性を有するポリペプチドを *in vitro* での繰り返し試行により創製する技術である。著者は、ヘビ神経毒を代表とする3本指（Three-Finger, 3F）型ペプチドの標的多様性に着目し、その分子骨格を鋳型として3本の指の先端部分に相当する3ヶ所のループ構造にランダム配列を提示する cDNA ライブラリを作製し、このライブラリからタンパク質加水分解酵素 trypsin に対する阻害剤を創製することを目指した。

試験管内進化は、puromycin を利用した「*in vitro virus* (IVV) 法」に従った。IVV 法では、cDNA ライブラリから無細胞タンパク質合成系により転写・翻訳を行い、個々のタンパク質はその C 末端翻訳終点において aminoacyl-tRNA の構造類似体である puromycin が取り込まれる。puromycin はリンカーを介して個々のタンパク質が由来する mRNA と結合させるため遺伝型 (genotype) と表現系 (phenotype) の対応付けが可能となる。標的となる trypsin をビーズに固定化し、trypsin に対する結合活性を指標として、IVV 法による選択操作を7回繰り返した。その結果、選択された cDNA クローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列は6種類に収束した。これらのタンパク質を遺伝子組換え体として調製し trypsin の酵素活性阻害試験に供したところ、5種類のタンパク質は trypsin 阻害活性を示し ($K_i < 450$ nM)、その中の2種類は天然の trypsin 阻害剤 BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) や STI (soybean trypsin inhibitor) と同程度に強い阻害活性を示した。

($K_i = 33 \sim 51 \text{ nM}$)。また同じくセリンプロテアーゼに属する chymotrypsin と kallikrein に対する阻害活性を示すペプチドも取得した。これらのペプチドは、セリンプロテアーゼに共通して保存される活性部位周辺構造を認識している可能性が示唆される。3F 型分子骨格ライブラリを用いた先行研究では指向的進化により、受容体のリガンド活性を持つペプチドやイオンチャネル活性の修飾ペプチドが取られており、本論文はそれらに加えて 3F 型分子骨格ライブラリ及び指向的進化技術が、酵素活性を修飾するペプチドを創製する上でも有効な手段であることを実証した。

標的分子特異的なペプチドは生物科学基盤研究におけるアフィニティー担体やイメージングツール等の分子ツールとしての利用が想定される他、更には疾患バイオマーカーの検出や抗体・抗体医薬に代替する分子創製等 診断・治療分野への利用展開が期待される。

審 査 の 要 旨

著者は、試験管内進化法を用い、ヘビ神経毒を代表とする 3 本指 (Three-Finger, 3F) 型ペプチドの標的多様性に着目し、その分子骨格を鋳型として 3 本の指の先端部分に相当する 3 ヶ所のループ構造にランダム配列を提示する cDNA ライブラリを作製した。次にこのライブラリからタンパク質加水分解酵素 trypsin に対する阻害剤をスクリーニングしその創製に成功した。すなわち著者は、試験管内進化法を多くの実験により体得するとともに、分子生物学の基礎を身につけた。この阻害ペプチドは新規のものであり今後社会でも応用が期待される物質であり大変興味深い論文である。

平成 25 年 1 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。