

論文審査の結果の要旨

氏名 樋野展正

タンパク質に天然にはない新たな置換基を導入することで、プローブ分子や、新規機能分子として働かせることができる。近年、生物の持つ翻訳システムを改変し、遺伝暗号を拡張することによって、天然にはない置換基を側鎖にもつ非天然型アミノ酸を、生きた細胞内で、タンパク質中に部位特異的に導入する手法が開発されている。この手法は、まず大腸菌細胞を用いて達成され、その後、動物細胞、酵母細胞でも可能になっている。動物細胞内に、非天然型アミノ酸を特異的に認識する *Escherichia coli* 由来のチロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS) を、*Bacillus stearothermophilus* 由来のアンバーサプレッサー tRNA とともに発現させた時、このアミノ酸はアンバー・コドンに対応してタンパク質に導入される。*E. coli* TyrRS はこのサプレッサー tRNA のみをアミノアシル化し、逆に、この tRNA は内在性のアミノアシル tRNA 合成酵素に認識されない。このように、この原核生物由来の TyrRS と tRNA は動物細胞の翻訳システムと「直交性」を保っており、非天然型アミノ酸がアンバー・コドン以外の位置に取り込まれないことを保証している。動物細胞内において、任意の部位に非天然型アミノ酸を有するタンパク質を発現させることで、より生理的な条件下におけるタンパク質の挙動の解析が可能になると考えられる。

論文提出者は、この技術を利用した細胞内シグナル伝達研究のための新たな手法の開発と、その検証を行った。

本論文は序章を含めた 4 章からなる。序章は、研究の背景と目的について述べられている。第 1 章は、チロシンの 3 位にかき高いヨード原子を有する 3-ヨ

ードチロシン (I-Y) をタンパク質に導入した場合の、I-Y のリン酸化と、特定のフォスファターゼによる脱リン酸化に対する耐性について述べられている。論文提出者は、まず、ヒト Src チロシンキナーゼの自己リン酸化部位に I-Y を導入し、これがリン酸化されることを示した。次に、リン酸化ヨードチロシン (pI-Y) 残基のチロシンフォスファターゼに対する感受性を、pI-Y を含む合成ペプチドもしくは Src を基質として調べた。このとき、CD45 および PTP1B は、これらの基質をほとんど脱リン酸化しないことを示した。しかしながら、細胞内には、pI-Y を含む Src を脱リン酸化するフォスファターゼが存在することが示唆された。これについて、論文提出者は、既に結晶構造が解かれているヒト PTP1B とリガンドペプチドとの複合体構造と、チロシンフォスファターゼの基質認識部位におけるアミノ酸配列の相同性を基に考察を加えており、pI-Y のチロシンフォスファターゼに対する感受性が、基質認識領域中に存在するひとつの残基のバリエーションによって決定される可能性について言及している。また、低分子量チロシンフォスファターゼなど別のファミリーに属するものによる脱リン酸化も考えられる。

第2章は、光クロスリンク能を持つパラベンゾイルフェニルアラニン (pBpa) をタンパク質に導入することによる *in vivo* 光クロスリンク法の開発について述べられており、既存技術に対する利点について議論されている。論文提出者は、既に開発されている pBpa 特異的 TyrRS を用いて、動物細胞内で pBpa をアダプタータンパク質 Grb2 の SH2 ドメインに導入した。細胞に 365 nm の光を照射することで、pBpa をリガンド結合部位近傍に導入した複数の Grb2 変異体が、一過性に発現させた EGF 受容体とその EGF 刺激によるリン酸化に依存してクロスリンクした。これらのクロスリンク体は、pBpa と結合リガンドとの間の距離に依存して形成された。さらに、pBpa 導入 Grb2 は、ErbB2 をはじめとする内在性の

複数のタンパク質とクロスリンクを形成することを示した。この *in vivo* 光クロスリンク法は、相互作用するタンパク質どうしを細胞内でクロスリンクさせることから、不安定なタンパク質複合体を安定に単離することができる。また、細胞を破砕した後に生じるような、本来の相互作用を反映しない複合体と区別することができる。このことは、動物細胞内におけるタンパク質間相互作用を調べる上で非常に有用である。

第3章では、本研究で開発された技術の細胞内シグナル伝達研究への応用について、また、様々な非天然型アミノ酸の利用について総合的に議論されている。

なお、本論第2章は、東京大学の横山茂之教授、坂本健作助手（現・理化学研究所）、小林隆嗣修士、岡崎有羽子氏、理化学研究所の林明子修士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。