

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊 藤 三 恵

本研究では、サイトカインLECT2 (leukocyte cell-derived chemotaxin 2) の核磁気共鳴 (NMR) を用いた高次構造解析を目指した大腸菌を宿主とするLECT2の発現、リフォールディングとその高次構造解析を行った結果について述べている。新規サイトカインであるLECT2の発現系の構築から構造解析まで、一連の構造解析のステップを全て行った。本論文は4章からなる。

第1章においては、サイトカインについての一般的な説明を行い、まず、その定義について記し、現在知られているサイトカインに共通する特色について述べた。次に、LECT2発見の経緯と機能について記し、明らかにされているLECT2の疾患との関係について述べた。LECT2は好中球走化性因子としてT細胞白血病細胞から発見された新規タンパク質であり、機能の詳細は不明であるが、慢性関節リュウマチと肝炎においてLECT2が鍵となるタンパク質として機能していることを述べた。LECT2はC-X-CモチーフもC-Cモチーフを待っておらず、一般的な好中球走化性因子の属するサイトカインの分類には属さない新規サイトカインであることを説明した。次に、LECT2の機能発現の機構を明らかにするためにLECT2の立体構造を明らかにしたいという本研究の目的について述べ、最後に本研究の構成について述べた。

第二章では、大腸菌を宿主とした発現系の構築について述べた。第一節においては、可溶性画分からの精製を試みた。単独発現、シャペロン (Thioredoxin, GroES/L) との共発現、融合タンパク質としての発現とそれらの培養条件を検討したが、可溶性画分への生産の増加は見られなかった。その中で最適化した単独発現においてLB培地1リットル培養から100 μ gを最終精製物として得、CDスペクトル、NMRスペクトルにおいて、基準物質とするCHO細胞から発現精製したLECT2 (以後、CHOLECT2) のそれらと同じ結果を得た。これにより、大腸菌を宿主とする (His)₆-LECT2の発現・精製に成功したことを示した。第二節においては、不溶性画分からの可溶化と巻き戻しについて述べた。この節は本論文のメインとなる部分である。大腸菌で不溶性画分に生産された (His)₆-ECT2を可溶化・還元し、Niカラムに固定したままで可溶化剤濃度を落としていくことで、分子間相互作用を抑えることができたので、液相での巻き戻し (透析法、希釈法) よりも、効率良い巻き戻しに成功した。さらに、(His)₆-ECT2をNiカラムに固定したままで酸化型グルタチオン/還元型グルタチオン混合溶液中で攪拌することで、誤ったジスルフィド結合をかけ直した。Niカラムからの溶出後、低タンパク質濃度で攪拌することで、フリーなチオール基を酸化した。以上の3つのステップを行うことで、オリゴマーの比率が減り、モノマーの比率が上昇した。ジスルフィド結合を持つタンパク質の一般的な巻き戻し法がなく、サンプル調製に大きな障壁となっている。本研究において開発した巻き戻し法は巻き戻し困難なタ

ンパク質に対し、多くの知見を与えた。また、巻き戻しの確認は基準物質とするCHO LECT2のCDスペクトル、NMRスペクトルと比較することで一致を見た。詳しく見ると、CDスペクトルにおいて230 nmにβシートを特徴づける山を示し、αヘリックスを特徴づける220 nmの吸収を示さなかった。NMRスペクトルにおいても1D、2Dともにシグナルの一致を見た。CHO LECT2と(His)₆-LECT2は立体構造上同じであることを示した。これにより、巻き戻しの確認とした。

第三章においては、NMRを用いた高次構造解析について述べた。第二章第二節で最適化した大腸菌を宿主とする発現、巻き戻しにより安定同位体標識 (¹⁵N, ¹³C/¹⁵N) 体を調製し、三核三次元NMRで高次構造解析を行ったことを説明した。まず、NMR測定溶媒条件の検討を行った結果、シグナルの分離が良いのは硫酸ナトリウムを添加した条件であった。そして、3次元展開した。NMRデータの帰属(どのシグナルがタンパク質のどの原子由来かを定めること)を行い、現在主鎖の帰属がほとんど完了している。得られた化学シフトを基に二次構造を予測したところ、βシート40%を含むことが示された。

第四章では、(His)₆-LECT2の大腸菌を用いた発現系の構築、NMRを用いた構造解析を行ったことにより明らかになった問題提示および考え得る今後の展開を述べた。また、(His)₆-LECT2の構造機能相関に終始するばかりでなく、ジスルフィド結合を持つタンパク質の新たな巻き戻し法を提案した。ここから得られた知見は、学術上、応用上貢献するところが大きいにある。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものとして判断した。