

論文の内容の要旨

論文題目

酵素を利用した蛋白質改変技術の開発とその応用

氏名 田中 勉

蛋白質は生体機能の中枢を担う重要な分子であり、またその優れた機能は産業の観点からも大きな応用可能性を持つ。その蛋白質を理解・利用するにあたり、蛋白質を自由自在に改変する技術、蛋白質工学は非常に重要な分野である。しかしながら既往の技術だけでは限界があり望みどおりの改変蛋白質を得ることはなかなか困難である。

そこで本論文では酵素を用いた蛋白質改変技術を提案しその有効性を実証すると共に、新しい蛋白質改変技術の創出を試みた。本研究の戦略は以下の通りである。はじめに蛋白質に酵素の基質となる短いペプチド「タグ」を導入し目的蛋白質に酵素の基質としての特性を付加する。次に酵素を利用してタグ部分を特異的に改変する。本手法は目的蛋白質に影響を与えずに改変することが可能である。

まず部位特異的蛋白質連結技術の開発に焦点を当てて研究を進めた。連結反応を触媒する酵素として微生物由来 transglutaminase (MTG) に着目した。MTG は基質となる配列が未解明であったため、その配列の探索を行った。ここでは S-peptide という配列が MTG のよい基質となることを見出し、この S-peptide を付加したモデル蛋白質 EGFP は MTG により二量体を生成することが判明した。次に S-peptide における連結部位の同定を行い、またアミノ酸置換を施してヘテロな二量体を選択的に得るタグへと改良することに成功した。更に蛍光共鳴エネルギー移動を用いて二量体の生成効率に対するアミノ酸置換の影響を検討し、カチオン性のアミノ酸が MTG の基質として適していることを明らかにした。また、蛋白質相互作用を用いて連結反応を抑制することに成功し、連結反応を制御できる可能性を示すことができた。

次に本技術の汎用性を高めるためにタグに焦点を当てた。様々な検討から N 末端のグリシンが MTG の基質となること及び蛋白質連結のためのタグとしてトリグリシン配列を見出した。この配列はこれまで報告されている TG を用いた蛋白質修飾の中で最も短く、簡便な配列といえる。更にこの技術を用いて蛋白質の N 末端に特異的に人工ペプチドをラベリングすることにも成功し、蛋白質に小分子を修する技術としても利用できる可能性を示すことができた。

本手法の大きな問題点として目的蛋白質それ自体が酵素の基質となる場合、タグ部分特異的に改変することは非常に難しい。すなわち様々な酵素、バリエーションを増やすことは本手法の汎用性を向上させるために非常に重要である。また、酵素の触媒する反応は非常に多岐にわたる。異なる酵素を用いることで蛋白質連結に限ることなく新しい蛋白質改変技術が創出できる可能性を持つ。そこで本研究では新たにペプチド転移酵素 Sortase に着目した。この Sortase を用い、新しい改変技術として蛋白質を環状化する手法の開発を行った。戦略として目的蛋白質の両末端に Sortase の基質となる配列を付加する。次に Sortase を加えて分子内で両末端をペプチド結合で連結し環状化蛋白質を得る。モデル蛋白質として用いた EGFP、DHFR はいずれも Sortase を加えると環状化されて泳動度が変化した。更に質量分析から蛋白質の両末端が連結されたことが確認され、酵素を用いて蛋白質を環状化する技術を確立することに成功した。

本論文では酵素を用いた蛋白質改変技術という分野を拡張し、蛋白質連結技術及び蛋白質改変技術を確立することに成功した。技術面に加えて酵素の基質特異性に関する新たな知見、また天然における環状化蛋白質生成機構に関する推察など学術的にも興味深い結果を得ることができた。今後本技術を更に発展させ、また他の蛋白質改変技術と組み合わせることで望みどおりに蛋白質を改変できるようになると期待される。