

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 田中 勉

蛋白質の諸性質を理解し、またその優れた機能を利用する上で蛋白質を自由に改変する技術は極めて重要である。しかし従来の化学修飾及び遺伝子工学的手法ではその改変部位の位置選択性が低く、また、導入できる分子が制限されるなどの問題点があるため、これを克服すべく様々な技術が開発されている。中でも酵素を利用した蛋白質改変技術は、酵素の基質特異性を利用することで部位特異的に蛋白質を改変することが可能であるが、現在までのところ、その適用範囲は蛋白質への小分子修飾に限定されている。

本研究は酵素を用いた異なる蛋白質の部位特異的連結法の開発にかかわるものである。すなわち、アシル転移酵素 transglutaminase が、立体的な自由度が高いフレキシブルな部位に存在するリジン残基とグルタミン残基を基質として認識し、これらのアミノ酸残基間を連結すること、またリジン残基の近傍に塩基性アミノ酸が存在すると基質としての反応性が高まることを明らかとしている。このようなリジン残基あるいはグルタミン残基を含むペプチドタグを、連結したい蛋白質のN末端、C末端、ループ領域に導入することにより、異種蛋白質の部位特異的なヘテロ二量化に成功している。さらに、立体障害の少ないN末端のグリシンが transglutaminase によるグルタミン残基との連結反応の良い基質となることを発見し、本連結技術をN末端特異的蛋白質連結・修飾法として発展させている。続いて、LPXTG という特異的なアミノ酸配列を認識してTとGの間で切断し、このTにN末端グリシンを有するペプチドあるいは蛋白質を連結するペプチド転移酵素 Sortase を用いた異種蛋白質の部位特異的連結技術の開発を行っている。さらに、異種蛋白質を連結する概念を分子内連結反応に拡張して、酵素を用いた蛋白質のN末端とC末端の連結による環状化技術の開発にも成功し、酵素を用いた蛋白質連結技術を大きく発展させている。

第1章では研究の背景、研究目的について述べている。

第2章では微生物由来 transglutaminase を用いて異種蛋白質を連結する手法の有効性を示している。目的蛋白質に transglutaminase の基質となるリジン残基あるいはグルタミン残基を含むタグ配列（以後、それぞれ K タグ、Q タグと呼ぶ）を遺伝子工学的に導入し、発現・調製した蛋白質のタグ部分を酵素により特異的に連結する技術の確立に成功している。RNaseA 由来の S-peptide 配列が transglutaminase の良い基質であることを見出し、この配列を改変してヘテロダイマーのみを選択的に得ることができる K タグ、Q タグ配列を見出している。さらにそれぞれのN末端に各種の K タグ、Q タグを遺伝子工学的に導入した蛍光蛋

白質 ECFP と EYFP を用い、transglutaminase による ECFP と EYFP の連結反応の進行に伴う FRET シグナルの変化を利用してタグ配列の反応性について検討し、リジン残基の近傍にカチオン性残基が存在する K タグが transglutaminase の良い基質となることを明らかにしている。

第 3 章ではタグ配列の多様性を増やすことを目的として transglutaminase の新たな基質配列について検討している。その結果、蛋白質 N 末端のトリグリシン配列が transglutaminase の基質となることを新たに見出し、N 末端グリシン特異的な蛋白質連結法へと発展させている。さらに、蛋白質の N 末端グリシンに特異的に小分子をラベルする技術としても応用できることを示している。

第 4 章では、ペプチド転移酵素 Sortase が L P X T G 配列の T と G の間で切断し、この T に N 末端グリシンを有するペプチドあるいは蛋白質を連結するという反応特性を利用して、蛋白質 1 分子内で N 末端、C 末端の連結反応を行い、蛋白質の環状化に成功している。環状化ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の熱安定性を分光学的手法により評価した結果、変性温度を 10 と大幅に向上させることに成功したと述べている。また、本酵素を用いて環状化した PH ドメインの脂質結合能を評価し、環状化 PH ドメインが本来の機能を保持していることを明らかにしている。さらに、遺伝子工学的に L P X T G 配列を介して Sortase と連結した EGFP あるいは DHFR を大腸菌内で発現させ、EGFP あるいは DHFR の環状化反応を大腸菌内で行うことにも成功し、環状化蛋白質の *in vivo* 創製技術を確立している。

第 5 章では本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文は transglutaminase による部位特異的な蛋白質—蛋白質連結技術、Sortase による蛋白質環状化技術という新規な技術を開発し、酵素を用いた蛋白質改変技術の有効性を実証したものである。これらの成果は、蛋白質工学分野ならびに化学生命工学分野の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格であると認められる。

