

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 武田 修治

任意の高分子を蛋白質に導入する技術は、遺伝子工学的手法を用いたアミノ酸置換などの既存の技術では困難な新規な機能を蛋白質に付与することができるため、蛋白質機能の改変技術として極めて有望である。例えば、機能性人工高分子や生体高分子を蛋白質に連結することによって、複合機能を有する蛋白質-高分子ハイブリッド分子を創製できる可能性がある。このような蛋白質の修飾法としては、どのような種類の蛋白質に対しても部位特異的に修飾を可能にする汎用性と特異性を有する連結技術が求められる。

本研究は蛋白質に対し DNA を部位特異的に連結する技術の開発とその応用にかかわるものである。共有結合的な連結方法として、チオエステルと N 末端システインの間に起こるネイティブケミカルライゲーション反応を利用し、蛋白質の N 末端および C 末端に部位特異的に DNA を共有結合で連結する技術の開発に成功している。得られた DNA 修飾蛋白質が蛋白質および DNA の両者の機能を保持していることを種々の方法によって明らかにしている。また末端特異的に修飾された DNA 修飾蛋白質の性質を利用して、DNA 結合蛋白質と 2 本鎖 DNA との相互作用あるいは相補的 DNA 鎖間の相互作用を検出するルシフェラーゼ断片の再構成実験を行い、これまで主に蛋白質-蛋白質相互作用、ペプチド-蛋白質相互作用などの検出に用いられてきた酵素断片再構成系の適用範囲を非ペプチド系分子間相互作用の検出へと拡張している。さらに大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) とその阻害剤 Trimethoprim (TMP) の間の高い親和性を利用し、DHFR 融合蛋白質に TMP 修飾 DNA を非共有結合的に連結することによって DNA 修飾蛋白質を作製する技術も確立している。このように、部位特異的な共有結合、非共有結合反応による機能的な蛋白質-DNA ハイブリッド分子の構築技術を開発し、DNA 修飾蛋白質の様々な分野への応用のための基盤を確立した。

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 章においては、DNA と蛋白質との連結法として両者の機能を損なう可能性の少ない、温和で部位特異的なネイティブケミカルライゲーションに基づく蛋白質への DNA 導入法を開発している。すなわち、末端アミノ基修飾されたオリゴヌクレオチドへのシステイン修飾試薬として、アミノ基とチオール基をそれぞれ Fmoc とターシャリーブチルチオール基で保護したシステインを NHS 活性エステル化した試薬 **1** とベンジルメルカプタンをリンカーによって NHS 基と連結したチオエステル化試薬 **2** を新規に合成している。この試薬 **1** で修飾して調製した末端システイン化オリゴヌクレオチドとインテイン融合発現系を利用して調製した C 末端チオエステル型の蛋白質の間のライゲーション反応により、バッファー中、温和な条件下で、蛍光蛋白質 ECFP、Protein G の C1 ドメイン、ホタルルシフェラーゼなど種々の蛋白質の C 末端特異的に DNA を効率良く導入できることを明らかにしている。また、インテイン融合蛋白質のセルフプライミング反応を利用して蛍光蛋白質 ECFP やレニラルシフェラーゼなどの N 末端にシステインを提示させておき、試薬 **2** で修飾した末端チオエステル化オリゴヌクレオチドと反応させることで N 末端特異的に DNA を導入できることも明らかにしている。末端特異的に修飾した蛋白質-DNA ハイブリッド分子に関して、DNA の機能が損なわれていないことを、1 本鎖 DNA 固定化プレート上への相補的 DNA 鎖修飾蛋白質の相補鎖配列特異的な固定化やトロンビン固定化プレート上へのトロンビン DNA アプタマー修飾蛋白質のアプタマー配列特異的な固定化を確認することにより検証している。蛋白質-DNA ハイブリッド

分子の蛋白質機能が保持されていることも、蛋白質の蛍光活性、酵素活性等の機能を評価することにより検証している。

さらに、DNA の配列内の任意の部位に蛋白質を固定することを可能にするため、核酸自動合成機で使用可能なシステイン様骨格を有するウリジンのホスホロアミダイト化を試み成功している。新たに合成した試薬 **3** はホスホロアミダイト法により核酸の任意の部位への導入が可能であり、また、試薬 **3** による修飾は 2 本鎖 DNA の安定性に影響を及ぼさないことを明らかにしている。さらに、試薬 **3** を導入したオリゴヌクレオチドに対して、C 末端チオエステル体蛋白質を部位特異的に連結することに成功している。このように、DNA 鎖の任意の位置に蛋白質を C 末端特異的に修飾する技術を確立している。

第 3 章においては、蛋白質末端特異的修飾の特性を生かした応用として、分割発現させた酵素の再構成系を構築している。分割発現と精製が可能であったホタルルシフェラーゼ断片の末端特異的 DNA 修飾ハイブリッド分子を作製し、二本鎖 DNA と Zinc finger との間の相互作用および相補的塩基配列を持つ DNA 鎖間の相互作用を利用した蛋白質再構成系を構築した結果について述べている。Zinc finger と二本鎖 DNA の相互作用検出系では Zn を再構成した時に、また、相補的 DNA 鎖間の相互作用検出系の場合には塩基配列と配向性特異的にホタルルシフェラーゼの発光活性が回復することを示し、酵素再構成系の相互作用部位を非ペプチド性分子とすることで、非ペプチド系分子間相互作用の検出系として用いることができることを明らかにしている。

第 4 章では、非共有結合的な蛋白質-DNA ハイブリッド分子の作製法を提案している。TMP 修飾 DNA を新たに合成し、大腸菌由来 DHFR と標的蛋白質の融合蛋白質を作製し、両者を混合することによって蛋白質-DNA のハイブリッド分子を得ることに成功したことを述べている。得られた分子は固相上に固定化した相補的な配列を持つ 1 本鎖 DNA とのハイブリダイゼーションが可能であり、また、DNA アプタマーをハイブリッド化してもアプタマーの性質を損なうことがないことを明らかにしている。また、哺乳類細胞において発現させた DHFR 融合蛋白質を TMP-DNA と連結し、基板上に固定化された相補的 DNA 鎖に温和な条件でハイブリダイゼーションさせ、位置特異的に蛋白質を固定化した蛋白質チップを自己組織的に作製することが可能であることを示している。

第 5 章では本論文の統括と展望を述べている。

以上、本論文は汎用性と修飾部位特異性を有する蛋白質-DNA ハイブリッド分子の新しい構築法を開発し、その技術を用いて調製した様々な蛋白質-DNA ハイブリッド分子の応用例を示し、本ハイブリッド分子構築技術の有用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。