

氏名(本籍)	やす かわ たか し 安川孝史(東京都)		
学位の種類	博 士(医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,560 号		
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	Increase of Solubility of Foreign Proteins in Escherichia coli by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin (大腸菌チオレドキシン蛋白質の共発現による外来蛋白質の可溶性の増大)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	岡 野 栄 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	林 英 生
副 査	筑波大学客員教授	薬学博士	増 保 安 彦
副 査	筑波大学教授	医学博士	山 下 亀 次 郎
副 査	筑波大学教授	医学博士	山 本 雅 之

論 文 の 要 旨

(目的)

ある蛋白質分子の構造解析を試みようとする場合、目的蛋白質を大腸菌を用いて大量に発現させることが、最初のステップとなる。しかし、従来の発現系を用いた場合、多くの真核生物の、特に全長蛋白質を大腸菌内で発現させた場合には、inclusion body と呼ばれる不溶性の会合体を形成してしまう。そのために、動物細胞の転写因子の全体構造は、ほとんど決定されていなかった。本研究は、目的蛋白質を大量に可溶性蛋白質として発現させる新しい発現系の開発を目的とした。

(実験・結果)

蛋白質を可溶性にするメカニズムは、まず完全には解明されていないが、翻訳されたポリペプチドが本来のふさわしい形に折り畳めないために、不適切な蛋白質相互作用を引き起こし inclusion body を形成してしまうと考えられている。この問題を解決するために、大腸菌のシャペロニンである GroE や、蛋白質の還元状態をコントロールする大腸菌のチオレドキシンを、目的蛋白質と共に過剰発現させる系を作製した。

実際に、この系を用いて細胞増殖に関与する転写因子である c-Myb, CRE-BP 1, p 53, SnoN, Myc, E 1 A, セリンプロテインキナーゼである Mos, 非受容体型チロシンキナーゼの LcK など 8 種類の蛋白質を発現させて調べた結果、1 L 培養当り 20 から 100mg を可溶性蛋白質として得ることに成功した。さらに GroE の系よりもチオレドキシンの系の方がより実用的であることが示された。

次に得られた可溶性蛋白質が本来の構造を取っているのか確認を行った。LcK は自己リン酸化活性を持っているので、従来の系で不溶性画分から得られたものを尿素で可溶化したものと、チオレドキシンの系で可溶性画分から得られたもの、各々の自己リン酸化活性の測定を行った。その結果、可溶性蛋白質の方が、不溶性のものに比べて 10 倍位高い活性をもっていることが確認された。

(考察)

上記の結果は、従来の系の不溶性画分から人工的に可溶化して得られた蛋白質は、本来のコンフォメーションを取っている分子の割合が非常に少なく、構造解析などに不向きだが、開発した系により得られた可溶性蛋白質は、本来のコンフォメーションを取っている分子の割合が多いため、構造解析などを行うには、非常に適していることを示唆するものであった。

以上の結果より、本研究で開発したチオレドキシシンを用いた発現系は構造解析に敵した可溶性蛋白質を大量に発現させることができる系であることが示された。

審 査 の 要 旨

本研究は、これまで可溶性蛋白質として調製が困難であった全長蛋白質を GroE, Trx を用いることで可溶性蛋白質として活性を損なうことなく大量調製することを可能にしたものである。今後は、以下の点について、さらなる解析が期待される。1) Trx がいかなる作用機構で蛋白質の正常な折り畳みに関与しているのか(異常なジスルフィド結合を切断する働きだけなのか)。2) Trx は、異常なジスルフィド結合だけを切断し正常なジスルフィド結合まで切断していないのか。3) 蛋白質の可溶化に GroE が有効な場合とほとんど無効な場合があるが、それらの蛋白質間に何か規則性が存在するのか。4) この発現系は、分泌型、受容体型の蛋白質を発現させる場合にも応用可能か。

これらの点で画期的であり、構造生物学に多大な貢献をしたものと評価できる。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。