

氏名(本籍)	はま だ ひろ ゆき (石川県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第4586号
学位授与年月日	平成20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	数理物質科学研究科
学位論文題目	Study on Solution Additive to Control Protein Aggregation (タンパク質凝集を制御する溶液添加剤に関する研究)

主査	筑波大学教授	理学博士	青木 貞雄
副査	筑波大学教授	理学博士	巨瀬 勝美
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫
副査	筑波大学准教授	理学博士	白木 賢太郎
副査	筑波大学准教授	理学博士	野口 巧
副査	鳥取大学准教授	工学博士	櫻井 敏彦

論文の内容の要旨

タンパク質はアミノ酸が直線的に重合したポリペプチド鎖で、固有の立体構造へと自発的に折りたたむ(フォールディング)ことにより、触媒能など様々な機能を発揮する。生体内では様々な因子(分子シャペロンやリガンド、糖類など)によってタンパク質が安定化されているのに対し、試験管内では特に安定化因子を添加しない限り、タンパク質は容易に変性し、しばしば不活性で不溶性の凝集体を形成する。この凝集形成反応は一般的に不可逆反応であり、そのままではもとの天然構造に戻ることはほとんどない。

タンパク質の凝集はその研究を推進する上で問題になることが多い。例えばタンパク質のリフォールディング研究にはストップフロー法などが用いられるが、多数のドメインからなるタンパク質は多量の凝集体を形成しやすいため、その研究対象は一部の単量体タンパク質に限られている。また、タンパク質3000プロジェクトなどの推進により、ここ数年で多くのタンパク質についてその立体構造が解明されたが、その過程においても凝集が大きな障害となった。例えば、構造解析の一つの手法としてNMR分光法が用いられるが、動的光散乱等で確認すると単分散であるタンパク質サンプルも、高濃度に濃縮された測定条件では凝集を形成する場合がある。また、X線結晶解析で構造を決定する場合でも、特に結晶化の過程で凝集が問題となる。結晶化条件はタンパク質が過飽和の条件で結晶化するのが一般的であるが、わずかな溶媒環境の変化によってアモルファスな凝集体が形成するため、不純物の除去やイオン強度、温度、pHなどについての厳密な条件設定が必要となる。

このような背景から、タンパク質の非特異的凝集を効果的に抑制する技術の開発が望まれている。その最も実用的なものに、凝集を抑制する化合物をタンパク質と共存させる方法がある。特に低分子量化合物を用いる方法は操作が簡便で、透析により化合物を容易に除去できるなど利点も多い。これまでにタンパク質の凝集を抑制する低分子量化合物がいくつか報告されている。例えば、タンパク質変性剤であるグアニジンは変性させない程度の低濃度において、タンパク質のリフォールディングにともなう非特異的なタンパク質凝

集を抑制する。また、極限環境微生物の一種である超好熱菌が産生するポリアミンは熱ストレスによる凝集を抑制することが知られている。さらに、アミノ酸の一種であるアルギニンはタンパク質凝集抑制能が高く、タンパク質の天然構造をほとんど不安定化させないことから広く利用されている。しかし、複雑なドメイン構造をもつタンパク質の場合、アルギニンを用いても十分な収率が得られないのが実情であり、より効果的な凝集抑制剤の開発が期待されている。また、これら化合物とタンパク質間の相互作用や凝集抑制の分子機構については、未だ十分な理解が得られておらず、特に化合物の物性とタンパク質凝集抑制能との関連性は、より効果的な凝集抑制剤を開発する上でも興味深い論点である。

第1章では、タンパク質のフォールディングと様々なストレスによって起こる凝集形成について基本的解釈を述べるとともに、現在までに開発されてきたタンパク質凝集の抑制法およびその発展について述べた。特に、タンパク質の凝集抑制剤に関する過去の研究動向を踏まえて、本研究の背景および意義、目的を述べた。

第2章では代表的なタンパク質の凝集抑制剤について、異なる凝集過程に対する効果の違いを調べた。実験にはモデルタンパク質としてニワトリ卵白由来リゾチームを用いた。凝集過程として、加熱および希釈リフォールディングに着目した。特に、希釈リフォールディングについては、常温希釈法の他に高温希釈法についても実験を行い、比較検討した。凝集抑制剤は、加熱凝集抑制剤として知られているアルギニンやスペルミジン、およびリフォールディングにおける凝集抑制剤として知られているグアニジンを用い、それぞれの凝集過程における効果を比較検討した。グアニジンおよびアルギニン、スペルミジンの3種類の化合物を加えたリゾチーム溶液を加熱し、残存活性と可溶性リゾチーム濃度を測定した。リフォールディングにおいては、還元変性させたリゾチームを100倍希釈した時のリフォールディング収率と可溶性濃度を測定し、その効果を加熱処理の結果と比較した。結果として、リゾチームの加熱凝集にはアミノ基やグアニジノ基など解離性側鎖を持つ添加剤が効果的であることが明らかとなった。また、希釈リフォールディングについてはグアニジンやアルギニンに高い効果が見られ、加熱凝集抑制に効果の高かったスペルミジンはリフォールディングに対して全く効果が無く、むしろ凝集を促進することがわかった。これらの結果から、3種の化合物の凝集抑制効果は凝集過程によって大きく異なることを明らかにした。さらに、これら添加剤のリゾチームに対する親和性をリゾチームの溶解度測定により見積もったところ、タンパク質との親和性が凝集の抑制に深く関与していることを明らかにした。

第3章ではアルギニン誘導体を網羅的に探索することで効果的な凝集抑制剤を見いだした。アルギニンの4つの官能基を置換した化合物を調べることで、リフォールディングにともなう凝集抑制に効果的な官能基を明らかにした。その結果、アルギニンアミドなど数種のアルギニン誘導体は、アルギニンよりも効果的にタンパク質凝集を抑制することがわかった。アルギニン誘導体によるタンパク質凝集抑制の作用機序を理解するため、タンパク質変性作用や分子の荷電状態を調べた。その結果、正電荷を有する化合物ほどリフォールディングにともなう凝集を抑制することが明らかとなった。またリゾチームのほかに、等電点などの性質が異なるカルボニックアンヒドラーゼをモデルタンパク質として、その凝集抑制効果を調べた。その結果、アルギニン誘導体は酸性側に等電点を持つタンパク質に対しても高い効果を示すことがわかり、汎用性の高い化合物となりうることが示唆された。

第4章では、前章での結果を受け、タンパク質の加熱凝集に対するアルギニンアミドの効果を調べた。また、十数種のアミノ酸アミド化合物についてもタンパク質の加熱凝集抑制能を比較し、化合物の官能基の違いが抑制効果に与える影響を調べた。その結果、アルギニンアミドの他にも、いくつかのアミノ酸アミド化合物はこれまでに知られているアミノ酸アルキルエステルなどの優れたタンパク質加熱凝集抑制剤を上回る効果を示すことが明らかとなった。

第5章では、本研究の成果を総括し、タンパク質溶液のデザイン法や応用の可能性について述べた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文ではアルギニンの化学構造に焦点を絞り、タンパク質の加熱およびリフォールディングにともなう凝集について、アミノ酸やその誘導体の凝集抑制効果を調べたものである。本論文で示されたように、アルギニン誘導体はアルギニンよりもタンパク質の凝集抑制効果が高く、多くのタンパク質に適用可能である。特に、アルギニンアミドなどのアルギニン誘導体にアルギニン以上の凝集抑制効果があるという報告はタンパク質の学術的研究のみならず、医薬品などの産業利用にも広く応用利用されるだろう。

よって、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。