

氏名(本籍)	とみ た しゅん すけ 富田峻介(滋賀県)			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	博甲第5892号			
学位授与年月日	平成23年7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	Development of Techniques Using Solution Additives for Protein Handling (溶液添加剤を用いたタンパク質ハンドリング技術の開発)			
主査	筑波大学准教授	博士(理学)	白木賢太郎	
副査	筑波大学教授	博士(工学)	藤田淳一	
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	博士(理学)	吉本敬太郎	

論文の内容の要旨

タンパク質は、代謝や免疫、シグナル伝達といった生体機能の発現の根幹を担う物質である。なかでも酵素は、高い基質・反応特異性や常温・常圧下において高効率で化学反応を触媒する働きを持つといった優れた特性を有する。ナノオーダーのサイズであるにも関わらず精緻な機能をもつタンパク質を、安定かつ自在に扱うことができれば工業や医療などの産業への応用が期待できる。しかし、現時点でのタンパク質の具体的な応用例は非常に限られている。この背景には、タンパク質の不安定性に起因するハンドリングの困難さという問題がある。一般に、タンパク質の安定性や機能を制御する場合、タンパク質の共有結合的な修飾や、遺伝子組み換えによるタンパク質の改変といった煩雑な操作、時間、コストがかかる手法が用いられる。これに対し、著者はタンパク質溶液に共存させる「添加剤」に着目し、これを利用する簡便な新しいタンパク質ハンドリング法を開発することを目的として研究を行った。

第二章では、リボヌクレアーゼAとリゾチームの中性溶液条件下での加熱失活はアミノ酸配列内の三つの化学修飾が原因であることに着目し、これらのタンパク質を化学的過程で失活するモデルタンパク質として用いて、タンパク質の化学的安定性を向上させる添加剤を探索した。様々な低分子量添加剤をスクリーニングした結果、特に、アミン化合物が両酵素の熱失活速度を著しく減少させることを見出した。これらの添加剤は、失活の原因である脱アミド化と β 脱離も同様に抑制し、各添加剤の化学修飾抑制効果は、熱失活抑制効果と高い線形相関を示した。つまり、低分子添加剤による熱失活抑制効果は、脱アミド化および β 脱離といった分子内化学修飾の抑制に由来すると考えられる。一方で、両親媒性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を両タンパク質と共存させると、熱失活速度が減少し、タンパク質濃度に依存しなくなった。つまり、PEG存在下では、熱失活の分子間反応が関与する律速過程、すなわち分子間ジスルフィド交換が抑制されたことを意味する。以上の結果により、適切な添加剤によってタンパク質失活の原因となる各化学修飾を選択的に抑制する技術を開発することに成功した。

第三章では、タンパク質が表面に正や負の電荷を持つことに着目し、多数の電離基を持つ高分子電解質を用いた酵素機能制御法の開発を行った。陽イオン性のリボヌクレアーゼA及びリゾチームは、対となる負

電荷を有するポリアクリル酸を共存させると不活性化し、続いて陽イオン性のポリアリルアミンを加えると再活性化した。一方、陰イオン性のセルラーゼ及び α -アミラーゼは、上記タンパク質とは逆の高分子電解質の組み合わせで酵素活性が制御できることが明らかとなった。さらに、酵素反応速度論的な解析によって、高分子電解質は酵素を“非競合的”に不活性化することが見出された。この結果は、酵素不活性化剤としての高分子電解質の選定には、酵素の“触媒部位”の特異的な構造ではなく、“電荷の表面分布”だけを考慮すればよいことを意味し、本制御法の汎用性の高さが明らかとなった。

第四章では、タンパク質の凝集過程に対する添加剤の効果を動的光散乱法と透過型電子顕微鏡を用いて調べた。等電点付近でのリゾチームの熱凝集の律速過程は拡散律速型であったが、アルギニンを共存させることで反応律速型に変化させることに成功した。さらに、熱凝集機構を変化させることによって、形成した凝集体の構造の粗密さを制御できることが見出された。

以上の研究によって、低分子量～高分子量添加剤の中から最適なものを選択することでタンパク質の安定性や機能、会合過程を自在に調節する技術が開発された。タンパク質と共存させる添加剤を合理的にデザインすることは、タンパク質の基礎・応用研究において重要な、タンパク質の自在なハンドリングを実現する上で今後必要不可欠な要素となるだろう。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は本論文において、タンパク質の安定性や機能、会合過程を溶液添加剤によって制御するハンドリング技術の開発を行った。本研究により、1) タンパク質の化学的安定性は、アルギニンやアミン化合物といった陽イオン性の低分子化合物やPEGといった両親媒性の高分子化合物を共存させることで改善できることが見出された。2) タンパク質の酵素機能は、一对の高分子電解質を用いるだけで自在に制御できることが示された。3) アルギニンをタンパク質と共存させることで、等電点付近でのタンパク質の熱凝集の律速過程を、拡散律速型から反応律速型に変化させることに成功した。これらの新規技術は、いずれも高い一般性を備えていると考えられ、タンパク質の溶液中でのハンドリングに関する重要な知見を与える。したがって本研究成果は、基礎・応用を問わずタンパク質が関連するあらゆる分野にとって有益なものとなるだろう。

平成23年6月16日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、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。