

氏名	藤田 智大
学位の種類	博士 ( 生物学 )
学位記番号	博 甲 第 9 2 5 1 号
学位授与年月日	令和元年 7 月 3 1 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	生命環境科学研究科

学位論文題目 酸処理SDS-PAGEによるプロテアーゼ含有タンパク質標品の簡便な純度分析法の開発

主査	筑波大学教授	博士 ( 農学 )	青柳 秀紀
副査	筑波大学教授	博士 ( 工学 )	市川 創作
副査	筑波大学教授	博士 ( 学術 )	中島 敏明
副査	筑波大学准教授	博士 ( 農学 )	吉田 滋樹

## 論 文 の 要 旨

酵素などのタンパク質を医薬用途で使用する場合、タンパク質の純度を正しく測定することが求められる。タンパク質の純度分析法としてSDS-PAGE法が一般的に用いられている。著者は、プロテアーゼ製剤であるディスパーゼ I (中性金属プロテアーゼのDプロテアーゼ) およびディスパーゼ I の高度精品をSDS-PAGE法で分析したところ、いずれもメインバンドであるDプロテアーゼ以外に、Dプロテアーゼよりも低分子側に多数のバンドを観察した。この結果から著者は、従来のSDS-PAGE法では、プロテアーゼの純度を正しく測定できていないのではないかと考え、研究を展開している。

はじめに著者は、ディスパーゼ I およびディスパーゼ I の高度精品を、SDS-PAGE法やゲル濾過クロマトグラフィー法により分析し、種々の比較検討をおこない、SDS-PAGE法で得られた両者のバンドパターンが完全に一致することや、不純物バンドが低分子側にしか認められないことから、SDS-PAGE法をおこなう際の前処理中に自己消化 (あるいは熱分解) によりDプロテアーゼが分解することを明らかにした。

次に著者は、前処理中のDプロテアーゼの分解を抑制するために、Dプロテアーゼの生化学的な諸特性に着目し、種々検討をおこなった結果、従来の試料の前処理法 (一般的なタンパク質変性剤の尿素や重金属、EDTAの添加) では十分な効果がえられなかった。そこで著者は、Dプロテアーゼ (中性プロテアーゼ) の至適 pH が 7.5 であることに着目し、酸を添加するとともに、試料の前処理中の熱分解を配慮し、煮沸をせずに試料を処理し、SDS-PAGE法をおこなうことを発案した。発案した方法を用いた結果、プロテアーゼ活性は即時に、不可逆的に失活し、試料の前処理中のDプロテアーゼの自己分解が抑制されることが示された。

著者は、添加する酸の種類や濃度を検討し、(1) pH 2.5以下であれば、試料の自己分解が抑制されること、(2) 添加する酸は硫酸が最適であり、0.05Mで使用すれば、電気泳動中のバンドの移動度に影響を与えないこと、を明らかにした。これらの知見を統合し、サンプル中に 0.05 M の硫酸を添加し、煮沸無しに電気泳動に供する簡

便な“酸処理 SDS-PAGE 法”を開発した。

開発した酸処理 SDS-PAGE 法を用いて精製度の異なる種々のディスパーゼ製剤に含まれる D プロテアーゼの純度を分析した結果、ディスパーゼ II は 80%、ディスパーゼ I は 92%、高度精製品は 98%以上であることが明らかとなった。また、高度精製品で 2%ほど認められる 30 kDa のバンドは酸処理 SDS-PAGE 法のアーティファクトではなく、分析前から混在している不純物であることも示された。以上の結果より、従来の SDS-PAGE 法ではできなかったディスパーゼ製剤に含まれる D プロテアーゼの正確な純度測定が、酸処理 SDS-PAGE 法により初めて実現できた。

また著者は、酸処理 SDS-PAGE 法の適用できる範囲についても種々検討をおこなった結果、中性プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、酸性プロテアーゼを含む一般的なプロテアーゼや、目的タンパク以外にプロテアーゼが混入しているモデル試料の純度分析にも使用できることを明らかにしている。さらに、キャピラリー電気泳動に酸処理 SDS-PAGE 法を応用し、サンプル処理前に硫酸を添加し煮沸せずにキャピラリー電気泳動を行うことで、正確に純度の分析を行うことが可能となることを示した。

以上の結果を踏まえ著者は、開発した酸処理 SDS-PAGE 法がプロテアーゼ含有タンパク質標品の簡便かつ正確な純度分析に有効であると結論づけている。

## 審 査 の 要 旨

本論文で著者は、広く国内外で使用されている SDS-PAGE 法や試料の前処理方法ではプロテアーゼやプロテアーゼを含む試料の分解を防ぎ、純度を正しく測定できないという普遍的な問題を、実験を通じて見出している。解決策として著者は、プロテアーゼの生化学的な特性に着目し、酸を用いて酸性条件 (pH2.5 以下) にすることで、プロテアーゼを失活させ、自己分解を防ぐ方法を独自に考案し、前処理として、硫酸 (0.05M) を試料に添加し、試料の煮沸処理なしに、SDS-PAGE 法に供する、簡便かつ正確な測定が実現できる、“酸処理 SDS-PAGE 法”を開発している。開発した酸処理 SDS-PAGE 法により、従来は正しく測定ができなかったプロテアーゼ製剤中のプロテアーゼの純度分析、様々なプロテアーゼの純度分析、プロテアーゼを含有する試料の純度分析がはじめて可能になっている。また、酸処理 SDS-PAGE 法のキャピラリー電気泳動法への利用も示されており、極少量の試料で、短時間、ハイスループットな純度分析も可能であり、今後、本法による培養液中の網羅的なタンパク分析やタンパク精製における目的タンパクの純度分析等、多くの分野での応用も期待できる。実際に酸処理 SDS-PAGE 法は企業の製造現場で実用的に使用されており、実学的にも優れている。

平成 31 年 1 月 15 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(生物工学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。