

平成 17 年 3 月 日

氏名 田中 勉



21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成 16 年度リサーチ・アシスタント報告書

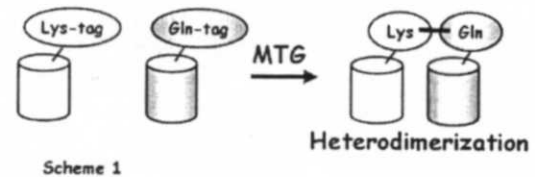
ふりがな 氏名	たなか つとむ 田中 勉	生 年 月 日
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻長棟研究室	
所在地	文京区本郷 7-3-1	
申請時点での 学 年	博士後期過程 2 年	
研究題目	酵素を用いた部位特異的タンパク質連結法の開発	
指導教官の所属・氏名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻教授 長棟 輝行	

I 研究の成果 (1000 字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

部位特異的かつその機能を失うことなくタンパク質を修飾する手法は、細胞工学等における重要なツールとなりうる。化学修飾法では「アミノ酸」特異的であるため真の意味で「部位特異的」修飾は難しい。そこで我々は transglutaminase (MTG) という、Gln と Lys 残基の側鎖を共有結合で架橋化する酵素に着目した。この高い基質特異性を利用しタンパク質を部位特異的に連結することができる

(Scheme1)。しかしながら認識配列はほぼ未解明であり、いかなる配列を付加すべきかの情報は (特に Lys ドナーにおいて) 皆無である。



Scheme 1

MTG は Lys 残基のアミンに加え第 1 級アミンも基質とする。そこで我々はタンパク質の N 末端のアミノ基が MTG の基質となるか検討した。N 末端に Gly を持つ EGFP は、Gln ドナーを持つ DHFR と架橋化され EGFP-DHFR ヘテロダイマーを生成した。N 末端が Ala など他の残基では架橋化は起こらず、この連結反応は N 末端 Gly 特異的であると示された。

次に N 末端に付加する Gly の残基数について検討を行った。Gly が 3 個以上では架橋化が効率よく進行するのに対し、Gly を 1 つ付加した EGFP ではほとんど架橋化が進行しなかった。加えて EGFP の N 末端のアミノ酸を GlyGlyGly に置換した変異体でも架橋化はほとんど進行しなかった。これより複数個の Gly に加え適切なリンカー部位が必要であることが示唆された。

これまで MTG を用いたタンパク質修飾はいくつか報告例があるが、いずれもタンパク質側に Gln ドナー、修飾する合成分子側に 1 級アミン (Lys) を付加して行われている。これは上述の通り MTG の基質特異性が未解明であるため、タンパク質側にどのような配列の Lys ドナーを付加すべきかという情報が無い事に由来する。我々の見出した N 末端 Gly 特異的連結法では、合成分子側に Gln ドナーを用いることが可能である。モデル系として MTG を用いて Gly-EGFP を Myc-peptide で修飾した。Anti-Myc 抗体で検出したところ、Gly-EGFP が効率よくラベルされることが示された。我々の開発した N 末端 Gly 特異的連結法は、末端 Gly の調製がたやすいこと、Gly を数個付加するだけでよいこと、Gln ドナーを持つ合成分子とタンパク質との修飾が可能であること、といった特徴を持つ。MTG を用いたタンパク質修飾を拡張し汎用性を高めることが出来たといえる。

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

Tanaka, T., Kamiya, N. and Nagamune, T. (2004)

"Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase" *Bioconjugate Chem.* 15. 491-497

Tanaka, T., Kamiya, N. and Nagamune, T. (2005)

"N-terminal Glycine-specific protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase" *FEBS Letters*. In press

氏 名 田中 勉

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

Tanaka, T., Kamiya, N. and Nagamune, T

“Site-specific protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase”

Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE) Kitakyushu,

2004/10/17-21

田中 勉、神谷 典徳、長棟 輝行

「酵素を用いたタンパク質連結のための新規ペプチドリンカーの探索」

酵素工学研究会第52回講演会 東京大学山上会館 2004/11/02