

平成 18 年 2 月 28 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17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 工学部 5号館 741	
申請時点での 学 年	博士後期課程 3 年	
研 究 題 目	酵素を利用した蛋白質環状化技術の開発	
指導教員の所属・氏名	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 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)

蛋白質は通常、N 末端と C 末端を持つ 1 本のポリペプチド鎖として生体内で合成される。その両末端を人工的に連結した環状トポロジーを持つ環状化蛋白質は熱力学的安定性やリガンドへの親和性の向上が見られ、蛋白質環状化は新たな蛋白質改変技術として注目を集めている。しかしながら現時点では蛋白質を環状化するにはプロテインスプライシングを用いざるを得ず、巨大な蛋白質を翻訳後、効率よく合成するための一般性の高い手法は開発されていない。そこで本研究では酵素を利用した蛋白質環状化法を提唱し、またバイオマテリアルなどの創製へ向けた改変蛋白質の新しい設計指針を提供できると考えている。

本研究では SortaseA というペプチド転移酵素に着目し、この酵素を用いた蛋白質の Head-to-Tail 環状化法を開発した。Sortase は認識配列 LPXTG の T と G の間を切断し、そこへ GG 末端を持つ別の蛋白質/ペプチドを連結する反応を触媒する。この Sortase を用いた蛋白質環状化戦略を Fig.1 に示す。まず目的蛋白質の N 末端にペンタグリシン、C 末端に LPETG 配列を付加して発現・調製する。次に Sortase を用いて分子内で GG 末端と LPETG 配列を連結することで、両末端がペプチド結合で連結された環状蛋白質が得られると考えられる。

モデル蛋白質として EGFP 及び DHFR を使い、それぞれ N 末端にペンタグリシン、C 末端に LPETGG 配列を付加した改変蛋白質を調製した。これらに Sortase を加えると蛋白質のバンドが低分子量側に移動した (Fig.2)。これは環状化により見かけの分子量が小さくなったためと考えられる。続いて質量分析を行ったところ、N 末端と C 末端が連結された質量に相当する断片のピークが得られた。以上より、酵素を用いて蛋白質を環状化する技術の開発に成功した。また、環状化 DHFR の熱安定性を CD スペクトルで評価したところ、変性温度  $T_m$  を  $10^{\circ}\text{C}$  向上させることができ、蛋白質の環状化はその機能向上に極めて有効であることが示された (Fig.3)

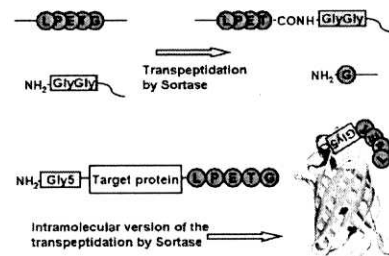


Fig.1 Sortaseを利用した蛋白質環状化戦略

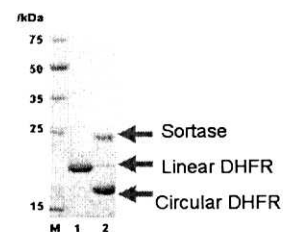
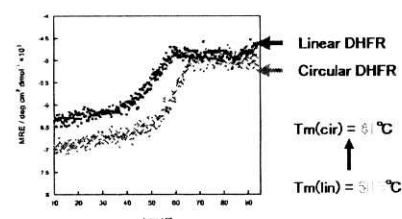
Fig.2 Sortaseを利用したDHFRの環状化反応  
lane1; Gly5-DHFR-LPETGG,  
lane2; Gly5-DHFR-LPETGG + Sortase

Fig.3 CDスペクトルを指標にした熱安定性の評価

氏 名 田中 勉

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）

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)

著者：田中 勉・築地 真也・長棟 輝行；

演題：ペプチド転移酵素を用いたHead-To-Tail環状蛋白質の翻訳後合成  
日本分子生物学会第 28 回年会 福岡 2005/12/7-9