

論文審査の結果の要旨

氏名 松長 遼

本論文では、重合性蛋白質 Protein shackle の設計、物性解析、そして応用について述べられている。

第 1 章では、蛋白質材料への展開を目標とした人工蛋白質の設計の背景について説明を行っている。遺伝子工学の発展により、蛋白質は自在に設計できるようになった。蛋白質の有する自己組織化能は他の合成分子では得難い特徴であり、この性質を活かして緻密なナノ構造体を創製する研究が広く行われている。そのなかで、本研究では蛋白質を直列に相互作用させて重合させるという方針を採用した。重合させる蛋白質の骨格として、レンサ球菌の線毛を構成する蛋白質 Spy0128 を利用した。Spy0128 の自発的な分子内イソペプチド結合形成能を利用して、重合性の改変蛋白質の設計を行うことにした。

第 2 章では、本研究を実施する際に用いた実験方法の詳細な説明が述べられている。

第 3 章では、重合性蛋白質の設計およびその性質の解析について述べられている。分子内イソペプチド結合を形成する Spy0128 の C 末端の β ストランド (Isopeptag) を N 末端に移し、自発的に重合が進行するような設計を考案した。さらに、生じた C 末端の空洞を、ジスルフィド結合によって酸化還元環境に応じて可逆的に開閉可能な蓋で覆うことにした。このように設計された蛋白質モノマーのことを Protein shackle (PS) と名付けた。実際に合成された PS は、予想通り還元環境で重合が進行する性質を有することが明らかになった。また、ポリマー溶液は広い分子量分布を示し、縮合重合のような重合様式をとることが示された。原子間力顕微鏡を用いた形態観察によりポリマーは高さ 1 nm 程度の非常に細い線維状構造体を形成することが明らかになった。さらに、線維中には周期的な節構造が観察され、モノマーが直列に配置されていることが示唆された。

第 4 章では、PS をモノマー状態で効率的に取得するための発現方法の検討について述べられている。大腸菌の細胞質内は通常還元環境であるため、細胞質内に PS を発現した場合 PS が重合を開始してしまう。このため、通常の方法ではモノマーを効率よく取得することが困難である。そこで、いくつかの手段を試みた。まず、細胞質内が酸化になるように遺伝子改変された大腸菌株を用いて発現を試みたが、効果は得られなかった。続いて、Isopeptag に結合して重合を阻害する蛋白質を共発現する手法を実施したところ、重合阻害効果が確認され、PS が細胞質内に多く蓄積された。また、低蛋白質濃度かつ酸化環境である培地に PS を分泌させる手法の開発にも取り組んだ。Tat 経路を利用した分泌は効果的ではなかったが、発現量は多くないものの Sec 経路による分泌は良好であった。

第 5 章では、Spy0128 に由来する PS のサブユニット間相互作用が、重合反応および

ポリマー構造に及ぼす影響について述べられている。Spy0128 は結晶構造において直列に配置されており、これは線毛における配置を反映していると考えられている。この結晶構造において相互作用している残基に変異を加えた PS 変異体を用意することで、その影響を精査した。変異体は重合速度が顕著に低下したが、Isopeptag 自体への反応性は維持したことから、サブユニット間相互作用が重合速度に関与していることが明らかになった。さらに、PS は酸化的環境においても溶液中にサブユニット間相互作用による会合体が生じていることが示された。また、円二色性偏光測定による温度変化測定により、ポリマー構造中でサブユニット間相互作用が実際に働いている可能性が示唆された。原子間力顕微鏡による形態観察により、変異体のポリマーは線維状構造を形成しないことが明らかになり、サブユニット間相互作用によって線維状構造が形成されることが示された。

第6章では、蛋白質材料への応用展開を目指した PS の機能化について述べられている。まず、モデルとして GFP を末端に融合した PS が蛍光能を維持したまま重合することが確認された。また、分子認識性ペプチドを末端に融合した PS は、ポリマー化することで標的の密集した部位への結合能を向上させることであることが示された。さらに、酵素の穏和な固定化法の開発を目指し、PS をポリアクリルアミドゲルに固定化する手法が開発された。

第7章において、以上の結果を総括している。PS は直列に重合して非常に微細で熱安定な線維を形成する蛋白質である。遺伝子融合による機能化も容易であり、多様な用途に応用可能であると考えられる。本論文の研究成果は非常に独創性が高く、今後の人工蛋白質設計に関する研究に大きく貢献するものと期待される。

したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。

以上 1964 字