

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成17年度入学 学籍番号05831103 氏名 加藤 淳 印		
主指導教員 氏 名	黒田 裕	副指導教員 氏 名	朝倉 哲郎
論文題目	単純化ウシ膵臓トリプシンインヒビター変異体を用いたタンパク質の安定性の熱力学解析及び新規溶解性向上法の開発 (Thermodynamic Analysis of Protein Stability and Development of A Novel Protein Solubility Enhancement Method Using Simplified Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Variants)		
<p>[論文要旨]</p> <p>タンパク質の安定性と溶解性は重要な性質である。タンパク質を生体内の生理的条件下と異なる条件下で利用すると、安定性や溶解性が低下し、変性や凝集を起こす場合がある。特に産業面において、タンパク質を高温や高濃度などの過酷な条件下で機能素子として利用する際、その安定性や溶解性が問題となり十分に機能を発揮しない場合が多い。そのため、タンパク質工学によって安定性や溶解性の向上を図ることで天然状態を安定に維持させることが行われている。しかしながら、これらの安定性や溶解性の向上のためのタンパク質工学は確立されたものではなく、実際には目的の効果を上げることが難しいのが現状である。これは、アミノ酸の変異などによってタンパク質全体の性質や機能にどのような影響を与えるのか予測できないことにあり、タンパク質の安定性や溶解性の理解が未だ十分に理解されていないことが大きな原因である。</p> <p>博士論文では、単純化ウシ膵臓トリプシンインヒビター（BPTI）変異体を用いた熱力学解析の研究から単純化タンパク質の安定性の重要な知見を得た。また、近年需要の高まりを見せているタンパク質の可溶化技術の開発を行い、新規溶解度向上タグであるSEP（Solubility enhancement peptide）タグについて報告した。</p> <p>本論文は四章から構成されている。</p> <p>第一章「緒論」では、タンパク質の安定性や溶解性が重要な性質であることから、タンパク質の安定化や可溶化機構の解明の必要性を述べると共に、現在行われているタンパク質の安定化や可溶化技術の説明を行った。また、タンパク質の安定性と溶解性の定義をした。タンパク質の安定性の定義は熱力学的安定性をタンパク質の安定性とし、タンパク質の溶解性の定義は天然状態からの会合や凝集状態が可逆であるときの天然状態の溶解性とした。最後に、単純化 BPTI 変異体を用いて研究することの意義について述べ、各章の意義と目的について述べた。</p>			

第二章「アミノ酸配列を単純化したBPTI変異体の熱力学的安定性の評価」では、単純化BPTI変異体であるBPTI-21、-22、-26、-27が天然タンパク質モデルであるBPTI-[5,55]と相似な構造を維持し、さらにBPTI-21、-22は同程度の T_m を維持しているという背景を基に、以上のBPTI変異体の熱測定を行い、単純化BPTI変異体の安定化機構の解明を行った研究をまとめた。熱測定は示差走査型熱量計(DSC)を用いて行い、単純化BPTI変異体の変性中点温度(T_m)、アンフォールド状態への熱容量変化(ΔC_p)、エンタルピー変化(ΔH)、エントロピー変化(ΔS)、自由エネルギー変化(ΔG)などの熱力学的パラメータを決定した。これらのパラメータと天然タンパク質モデルであるBPTI-[5,55]のパラメータを比較することで単純化タンパク質の安定化の評価を行った。その結果、単純化タンパク質は天然タンパク質と同様に、アンフォールド状態の転移において可逆であり、高い協同性を持つことが示された。また、単純化タンパク質の疎水コアのアミノ酸側鎖の充填は重要であり、タンパク質の分子内のコア部分は構造形成において重要であることが分かった。表面残基を中心にアラニンに置換した単純化タンパク質が大きなエントロピーの不安定化にも関わらずエンタルピーによって安定化されていたことは、タンパク質分子の安定性に表面残基の特性が関係していることが示唆された。

第三章「SEP(Solubility Enhancement Peptide)-tagによるタンパク質の溶解度向上方法」では、BPTI-22のCまたはN末端に親水性残基を付加する段階的アミノ酸付加法によって、親水性残基がタンパク質の可溶化に与える影響について述べると共に、新規溶解度向上タグであるSEPタグの有用性を明らかにした。段階的アミノ酸付加法によって得られた溶解度実験の結果は、アミノ酸の水和自由エネルギー(ΔG_{hyd})のみでタンパク質の可溶化を説明することが困難であり、新しいアミノ酸の溶解性パラメータの必要性が示された。さらに、BPTI-22の構造や機能においてSEPタグは、大きな影響を与えることなく溶解度のみを効果的に向上することが確認できた。

第四章「結論」では、得られた成果を要約し、本研究の意義を述べた。