

平成 30 年 2 月 12 日

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 生命工学 専攻 平成 25 年度入学 学籍番号 13831107 氏名 Md. Golam Kabir 印
主指導教員氏名	黒田 裕
論文題目	短いペプチドタグを付加して生成したタンパク質の可溶なアモルファス凝集体・会合体の生物物理学的解析

凝集は、分子の濃度が溶解限界濃度（以下、溶解度）以上になると起きる現象であり、タンパク質やペプチドの凝集は産業利用においてしばしば問題となるほか (Frokjaer S et al, *Nat Rev D.D.* 2005)、種々の神経変性疾患の病因であると考えられている (Ross CA, *Nature Med* 2004)。現在、ペプチドやタンパク質の溶解度は構成アミノ酸の親水性・疎水性で決まるというのが定説であるが、親水性・疎水性は本来、水溶液及び非極性の有機溶媒に対する相対的な「溶けやすさ」を示す指標であり、水溶液中での溶解度を表す指標ではない。本博士論文では、牛腓臓トリプシンタンパク質 (BPTI) をモデルに用いて、凝集形成の経時変化、及び可溶性会合体の物性の解明を目指した。

第 1 章「緒論」では、タンパク質の溶解性及び凝集に関する研究の背景を説明した。溶解性に関する物理化学的な研究、新水性・疎水性と溶解性との関係に関する研究、凝集や会合形成に関する研究に対して詳しく述べた。さらに、タンパク質の凝集に関連する物理化学的な研究を概説した。

第 2 章では、BPTI の末端に、1 種類のアミノ酸からなる約 5 残基の SCP タグを付加することによる会合状態の制御を試みた。タグを形成するアミノ酸には、20 種類中 Arg、Lys、Leu、Ile、Val、Ala、Lys、Ser、Asp、Asn、Gln、Glu、Pro、His の 14 種類のアミノ酸を用いた。会合形成傾向性は、解析対象となるアミノ酸からなる SCP タグを付加しての BPTI の会合状態を、DLS (動的光散乱) と SLS (静的光散乱) を用いて測定した。その結果、5 個のイソロイシン (C5I) を付加した変異体が 4~5nm の会合体を形成することを明らかにした。また、ロイシン (C5L) も 3nm 程度の会合体を形成していた。そのほかのアミノ酸からなる SCP タグを付加した変異体は、DLS 測定によると会合体を形成しなかった。さらに、C5I による会合体を詳細に調べたところ、BPTI-C5I は 15°C では会合しないが、25°C では可逆的に会合した。この観測から、会合体は温度に伴う疎水性相互作用の増強によって形成されることが推測され、温度を低下すると会合体が解離することも説明できる。以上のことから、わずか 5 残基をタンパク質の末端に付加するこ

とで、その会合状態を可逆的に制御することが出来ることが強く示唆された。

第3章では、蛍光クエンチ効果を用いて、タンパク質の凝集を観測することを試みた。従来の凝集評価法であるSLS法やDLS測定を行いFAM標識したBPTI変異体の溶解性と凝集性を調べたところ、アスパラギン酸からなるSCPタグを付加したBPTI変異体はタグを付加していない変異体より溶解度が向上し、ほとんど凝集しなかった。一方、アラニンやセリンからなるペプチドタグを付加したものはそれらの中間の傾向を示した。次に、DLSやSLSと同じ条件で蛍光測定を行ったところ、タンパク質の凝集体形成に伴って蛍光強度が低下することを確認した。即ち、会合によって蛍光クエンチ効果が生じることを確認した。さらに、SLSによる凝集性及びDLSによる粒子径と蛍光強度を比較した結果、蛍光クエンチのシグナル変化は、単純にタンパク質の凝集体の大きさや量を表しているのではなく、タンパク質凝集の初期に起こるタンパク質同士の相互作用の増加を反映していることが示唆された。このときの粒子径は、SCPタグの種類によって異なり、粒子径が大きいほど、SLSなどで観測のできる凝集体が形成される時間が短いことがわかった。これらの観測は、凝集体の形成が、凝集の初期段階に起こるタンパク質同士の「相互作用」の増加と、その後の凝集への成長という2つの異なる過程に分かれており、初めの段階がその後の成長過程に重要な影響を与えることを示唆している。また、本実験により、蛍光強度のシグナル変化が凝集体形成の初期過程を解析するための重要なツールとなり得ることが示された。

第4章では、2章と3章で説明した結果を総括した。本研究によって、タンパク質の末端に数残基から成るSCPタグを付加することで、その会合状態を制御することが可能となったこと、また凝集の初期段階で形成される粒子の大きさによって最終的な会合状態又は凝集状態が決定されることが明らかにされたと結論付けた。