

架橋酵素触媒反応を用いたタンパク質重合体の創製 とその機能亢進のための反応場設計

佐藤, 峻

<https://hdl.handle.net/2324/6787579>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 佐藤 峻

論 文 名 : 架橋酵素触媒反応を用いたタンパク質重合体の創製と
その機能充進のための反応場設計

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質は生命活動の維持に必要な不可欠な生体高分子であると同時に、多彩な機能を発揮するナノ材料でもある。天然のタンパク質の多くは、非共有結合性相互作用または共有結合形成によって集合化することで、構成分子間の協働的な相互作用により、単量体では実現できない高次機能を発揮する。特に共有結合的に集合化したタンパク質集合体（タンパク質重合体）については、非特異的な化学修飾に基づく調製法が主流であることから、タンパク質の失活を防ぎつつ、機能性タンパク質を主要構成因子とする汎用的なタンパク質重合化法は確立されておらず、その応用例も限定的である。

一方、天然においてタンパク質重合体が機能する細胞内の溶液環境は、タンパク質や核酸等の生体高分子で込み合った分子クラウディング環境となっており、一般的な生化学実験で用いられる緩衝溶液とは全く異なることが知られている。加えて、細胞内ではタンパク質や核酸が濃縮されることで一部が相分離していることが明らかとなってきた。そこで本研究では、共有結合形成反応を触媒する酵素反応を用いて汎用的なタンパク質重合化法を確立し、分子クラウディング環境や相分離環境におけるタンパク質重合体の挙動を評価することで、タンパク質重合体の設計ならびに活用について新たな知見を得ることを目的とした。

本小論の構成は以下の通りである。

第一章は序論であり、タンパク質重合体について定義を行った。また、天然及び人工タンパク質重合体の例を挙げ、特に人工タンパク質重合体の調製法について既往の研究例と課題をまとめた。

第二章では共有結合形成反応を触媒する酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を用いて汎用的なタンパク質重合化法の確立を試みた。MTG はグルタミン (Q) およびリジン (K) 残基側鎖間の架橋反応を触媒する酵素である。まず初めに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の C 末端に MTG 反応性の Q 残基を含むペプチドタグ **StrepTag I** を融合した **EGFP-StrepTag I (YKAWRHPQFGG)** を作製した。当該タンパク質と MTG を混合すると顕著な高分子量化が観察され、EGFP の C 末端の K 残基と StrepTag I 中の Q 残基で架橋が進行したことが示唆された。次に K 及び Q 残基前後のアミノ酸への変異導入により最も重合化が促進されるペプチドタグを探索し、最終的に得られたペプチド配列 (**HKRWRHYQRGG**) を、タンパク質のポリマー化を可能にするタグという意味を込め **PolyTag** と命名した。また、**PolyTag** を融合した異なる組換えタンパク質を用いた検討から、MTG と **PolyTag** による重合化の汎用性と異種タンパク質重合体の特異な機能を発現することを確認した。

第三章では、より高度に重合化されたタンパク質重合体を獲得するために、生細胞内環境である分子クラウディングに注目した。初めに分子クラウディング環境における MTG 触媒挙動を理解するため、デキストラン (Dex) を用いて調製した分子クラウディング模擬溶液中で MTG 反応性を有する蛍光小分子基質および蛍光タンパク質基質の架橋を行い、基質の分子量が MTG の触媒挙動に与える影響を評価した。架橋産物由来の蛍光共鳴エネルギー移動を指標とした酵素活性の評価の結果より、蛍光小分子基質同士の架橋は分子クラウディング環境中で抑制されるが、高分子量のタンパク質基質同士の架橋は促進されることを見出し、基質の分子量が MTG の架橋反応に影響を与えることを明らかにした。次に、上記で得られた知見を基に N 末端に PolyTag を融合した EGFP (PolyTag-EGFP) の MTG による重合化挙動を Dex 溶液中で実施した。その結果、Dex 溶液では緩衝溶液と比較して六量体以上の架橋産物の生成が約 1.8 倍促進されることが明らかとなり、分子クラウディング環境が巨大タンパク質重合体の調製に有用な溶液環境となることが示唆された。

第四章では、細胞内の液-液相分離状態を二種類の水溶性高分子を用いて人工的に模倣した水性二相系に着目し、これとタンパク質重合体を組み合わせた生体分子の分離・検出を志向した基礎検討を実施した。まず解析対象の分子として蛍光標識された Streptavidin (SA)、SA と特異的に相互作用する分子として biotin を標識した PolyTag-EGFP を調製した。液-液相分離条件はポリエチレングリコール (PEG) 溶液と Dex 溶液を利用して調製した (PEG/Dex 系)。これらを用いて PEG/Dex 系における PolyTag-EGFP-biotin 重合体と H555-SA の局在を評価したところ、前者は Dex 相、後者は PEG 相選択的に分配すること、両者を混合すると各タンパク質の相選択性が変化することが明らかとなり、PEG/Dex 系を利用した標的分子の目視検出系の構築の可能性が示された。

第五章として、本論文の総括を行い、本研究の今後の展望について述べた。