

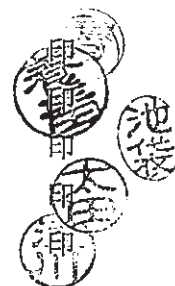
(様式 11)

平成 30 年 2 月 14 日

学 位 論 文 審 査 要 旨 (課程博士)

東京農工大学大学院工学府長 殿

審査委員 主査 黒田 裕
副査 養王田 正文
副査 池袋 一典
副査 太田 善浩
副査 津川 若子



学位申請者	生命工学専攻 平成 25 年度入学 13831107 学籍番号 (16891001)
	氏 名 Md. Golam Kabir
申請学位	博 士 (工学)
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性アモルファス凝集体・会合体の生物物理学的解析 Biophysical characterization of soluble protein aggregates and oligomers controlled using short amino acid peptide tags
論文審査要旨 (2000 字程度) 本博士論文では、牛腓臓トリプシンタンパク質をモデルタンパク質に用いて、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議論をした。本博士論文は 4 章から成っている。 第 1 章では研究の背景を述べている。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, <i>Nat Rev D. D.</i> 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, <i>Nature Med</i> 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・疎水性で決まるとというのが定説であるが、本来このモデルは、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」を示す理論であり、水溶液中での溶解度や凝集形成を説明するための理論ではない。一方本博士論文では、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研究を概説し、現在までに開発されている、物理化学的な視点による研究を紹介した。 第 2 章では、BPTI の末端に 5 残基から成る SCP タグ（1 種類のアミノ酸がらなる 5 残基配列）を付加することで、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。会合形成傾向性の測定では、解析対象となるアミノ酸を、数百 μ M の BPTI に一種類のアミノ酸5個から成るペプチドタグを付加した変異体を構築し、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 の会合体を形成し得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、タグの疎水性相互作用によって、会合体が形成されていることが推測され、会合体形成に温度依存性が見られた。15 $^{\circ}$ C では、BPTI-C5I は会合体を形成しなかったが、会合体は温度に伴う疎水性相互作用の増強によって、25 $^{\circ}$ C で会合体が形成された。以上のことから、わずか5残基のタグをタンパク質の末端に付加することで、その会合状態を制御することが出来ると考えられる。

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静的光散乱法 (SLS) や動的光散乱 (DLS) 測定を行い変異体の溶解性と凝集性を調べたところ、負電荷をもつペプチドタグを付加した変異体はペプチドタグを付加していない変異体に対して溶解度が向上し、ほとんど凝集しなくなった。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。次に我々は、同条件下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現象 (蛍光クエンチ効果) を確認し、SLS や DLS の結果から得られた変異体間の凝集性と良い対応がみられることを示した。さらに、凝集開始直後からの SLS 測定及び DLS 測定による粒子径、及び蛍光強度の時間変化測定を行った結果、蛍光クエンチのシグナル変化は、単なる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による凝集核の形成過程のみを反映することが分かった。この凝集核の大きさは、ペプチドタグの種類によって異なり、この凝集核が大きいほど、平衡状態に達する時間が速いことが分かった。また、これらのことは、凝集体の形成は、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による凝集核の形成過程と、その後の成長過程という2つの異なるフェーズに分けられ、初めの段階がその後の成長過程に極めて重要な影響を与えることを示唆している。さらに、蛍光強度のシグナル変化が凝集体形成の重要な初期過程を解析する重要なツールとなり得ることを示している。第4章では、2章と3章で説明した結果を総括した。今後、短いタグを付加することによって、生体内で、タンパク質を数 nm の会合体に安定化させるための技術が開発されると期待される。以上、本学位論文を全委員一致で合格と判定した。

審査経過(通常の審査の場合)

平成29年12月8日 平成30年3月博士後期課程終了に関わる学位申請

平成30年1月10日 審査委員の選出・氏名・付議、論文審査員の付託(運営委員会)

平成30年2月9日 学位論文発表

平成30年2月14日 専攻会議で論文合格及び最終試験合格を承認

平成30年3月4日 学位授与認定・修了認定(運営委員会)