

## 学位論文の内容の要約

氏名	Md. Golam Kabir
学位の種類	博士(工学)
学府又は研究科・専攻	大学院工学府 生命工学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	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

## 【論文の内容の要約】

タンパク質の不定形(又はアモルファス)な凝集及び溶解性を物理化学的な視点から解明することは、学術的のみならず、バイオ産業への応用の観点から重要である。本博士論文では、ウシ膵臓トリプシン阻害タンパク質変異体(BPTI; BPTI-19A は 58 残基のうち 19 のアラニンを含む人工製した BPTI 変異体)をモデルに用いて、そのC末端に付加する 5 残基の短い溶解性制御ペプチドタグ(SCP タグ)が、「目視されない可溶性凝集体」(sub-visible aggregate)の形成及び溶解性へ及ぼす影響を物理化学的な視点から調べた。

具体的には、BPTI-19A の末端に 5 残基から成る SCP タグ(1 種類のアミノ酸からなる 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 種類の天然アミノ酸中 Arg, Ile など 14 種類の代表的なアミノ酸を用いた。タンパク質の会合状態を DLS(動的光散乱)と SLS(静的光散乱)を用いて測定した。5 個のイソロイシン(C5I)とロイシン(C5L)を付加した変異体が、それぞれ、4~5nm 及び 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 測定によると会合していなかった。さらに、C5I による会合体は、15°Cでは形成されず、25°Cに温度を上げることで会合が観られ、温度を 15°Cに戻すと会合体は解離した。即ち、C5I による会合体の形成は、タグの疎水性相互作用の温度に伴う増強による会合であると考えられた。

さらに、本論文後半では、蛍光クエンチ効果を用いてFAM(フルオレセイン)蛍光標識した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-19A 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-19A 変異体は SCP 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 SCP タグを付加した変異体の溶

解性はその中間にあった。次に、DLS や SLS と同じ条件で、凝集体の形成に伴う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が示唆された。そのとき、蛍光クエンチのシグナル変化は、SLS による凝集性及び DLS による粒子径の変化とは一致せず、タンパク質凝集の初期に起こるタンパク質間相互作用の増加による過程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」の増加による過程と、それらが凝集へ成長するという2つの過程に分かれており、初めの過程がその後の凝集への成長過程を決めてい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(蛍光クエンチング)が凝集体形成の初期過程を検出するための重要なツールになり得ることが示された。

以上、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。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、最終的な凝集状態が決まることが明らかにされた。

---