

氏名	ひら た あき よし 平 田 晃 義
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学位記番号	エネ博第 147 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻
学位論文題目	タンパク質組織化構造体の形成機構

論文調査委員 (主査) 教授 森井 孝 教授 吉川 暹 教授 木下 正弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、バイオナノマテリアル創製に関わる基盤研究として、タンパク質およびタンパク質と核酸の間の分子認識機構と規則的な組織体形成機構に関する研究を論じた結果をまとめたもので、6章からなっている。

第1章は序論であり、研究の背景をまとめている。特にタンパク質およびタンパク質と核酸の組織体形成について、それらの構造および組織体形成機構を論じるとともに、タンパク質組織体を利用した機能性ナノ材料創製の現状について記述されている。

第2章では、生体高分子間の組織体形成における分子認識機構として、DNA 認識タンパク質と DNA との組織化構造体の形成機構に注目した。植物由来の転写因子である EmBP1 と酵母由来の転写因子である GCN4 の DNA 認識領域ペプチドに、 $\beta$ -シクロデキストリン/アダマンタン包接結合を導入することで同種または異種二量化し、それらの DNA 塩基配列選択的な組織体形成を解析した。EmBP1 の DNA 認識領域ペプチドをホスト-ゲスト包接結合モジュールで同種二量化させた場合、天然の EmBP1 の認識配列である Gbox 配列 DNA だけでなく Cbox 配列 DNA とともに組織体を形成した。このことから、天然の EmBP1 タンパク質では、直接 DNA と結合する塩基性領域だけでなく、二量化ドメインであるロイシンジッパー部位およびそれに近接するヒンジ領域が、DNA 塩基配列の分子認識と組織体形成に関与していることが明らかになった。

第3章では、タンパク質が組織化したナノ構造体として、神経変性疾患にみられるアミロイドに代表される凝集性タンパク質に注目し、その会合・組織体形成機構の解明を目指した。アルツハイマー病患者の脳内沈着物中に含まれるタウタンパク質が高度にリン酸化を受けていることに注目し、リン酸化によりタウタンパク質の組織体形成が制御される可能性を探った。タウタンパク質の繰り返しドメインに存在する凝集コア配列のリン酸化は、タンパク質の組織体形成に大きな影響を与えるものと予想した。そこで、凝集コア配列ペプチドと、その配列中のチロシン残基をリン酸化したペプチドを化学合成し、それらの組織体形成を比較検討した。その結果、ペプチドの組織体形成において、ペプチドのネットチャージが重要であることが明らかになった。リン酸化したペプチドは、ペプチドのネットチャージが中和されることで溶解度が低下するとともに、ペプチド間の静電的な反発が減少することによって、繊維状組織体形成が促進された。一方、ネットチャージが中和されていないペプチドでは、溶解度の上昇と分子間の静電的反発の増大により組織体形成が抑制された。タウタンパク質の繰り返しドメインはリシン残基が多く含まれるカチオン性ドメインであるため、タウタンパク質が高度にリン酸化されることで電荷が中和され、アミロイド組織体形成が促進される機構を提唱した。

第4章では、タウタンパク質の凝集コア配列に存在するチロシンが、翻訳後修飾でニトロ化される可能性に注目し、チロシン芳香環水酸基のオルト位ニトロ化が組織体形成に与える効果について検討した。凝集コア配列中のチロシンをニトロ化したペプチドを合成し、ペプチドの組織体形成を解析したところ、チロシンのニトロ化により、ペプチドの組織体形成が促進されることが明らかとなった。チロシンのニトロ化によりフェノール性水酸基の pKa が低下することで、ペプチド内の

リシン側鎖のカチオンと解離した水酸基との静電的な相互作用が強まると考え、電荷の中和によりペプチド組織体の形成が促進される機構を提唱するとともに、タウタンパク質のアミロイド組織体形成における、チロシン残基化学修飾の重要性を示した。

第5章では、タウタンパク質の繰り返しドメインに存在する凝集コア配列のチロシン残基を非天然アミノ酸に置換したペプチドを合成し、それらの組織体形成を解析した。チロシン残基の側鎖芳香環4-位にフェニル基を導入することで疎水性を高めた場合、透過型電子顕微鏡の観察結果より、繊維が束になった形状の組織体形成を観測した。ペプチド中のチロシン位置での疎水性を増加させることにより、繊維状組織体形成が速度論的に促進されることを明らかにした。

第6章では、タウタンパク質凝集コア配列内のチロシン残基と、その周辺に存在するセリン残基のリン酸化が繊維状組織体形成に与える影響を検討した。その結果、セリンおよびチロシン残基の両方がリン酸化されたペプチドでは、繊維状組織体形成が抑制された。凝集コア配列周辺を含めたペプチドの静電的反発により、凝集体形成が阻害された結果、繊維状組織体の形成が制御される機構が明らかになった。

第7章は本博士論文の総括であり、本研究で明らかになったペプチドの繊維状組織体形成機構をもとにして、新たな形状と化学的性質を持った生体高分子組織体形成への展望が述べられている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、ペプチドを利用した規則的形状と大きさを持つ組織体の創製と、繊維状タンパク質組織体の形成機構に関する新たな知見を得ることを目的として研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

まず、ペプチドとDNAとの分子認識を利用した組織体形成を、有機分子包接化合物によって制御することに成功した。シクロデキストリンとアダマンタンを用いてペプチドとDNAとの組織体配向を制御できる本方法論は、ペプチドとDNAに限らず、多様な生体高分子による組織体形成を制御する方法となることが期待される。

また、タンパク質が組織化したナノ構造体として、神経変性疾患にみられるアミロイドに代表される凝集性タンパク質に注目し、凝集性タンパク質の繊維状組織体形成に重要とされるアミノ酸配列を持つペプチドを化学合成した。このペプチドのチロシン側鎖をリン酸化することによって、ペプチドの凝集特性とペプチド組織体形状を制御できることを見いだした。この結果は、アルツハイマー病患者の脳内沈着物中に含まれるタウタンパク質が高度にリン酸化されている事実との関連が注目される。同じく、ペプチドのチロシン側鎖をニトロ化することにより、ペプチドの繊維状組織体形成が飛躍的に促進されることが明らかになった。チロシン残基部分における化学修飾の重要性が明らかになったため、チロシン残基部分を非天然アミノ酸に置換したペプチドを化学合成し、その組織体形成を検討した。その結果、チロシン残基側鎖芳香環にフェニル基を導入することにより、繊維が束になった形状の組織体を作製することに成功した。これらの知見をもとにして、ペプチドの電荷と疎水性を制御することにより、特定の大きさと形状を持つペプチド組織体の開発が可能になると考えられる。

以上、本研究は、環境に適合したエネルギー材料としてのバイオナノマテリアル開発に関し、合成ペプチドを用いた様々な規則的形状と大きさの繊維状組織体の開発に大きな貢献を行ったと評価する。よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成19年1月25日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。