

京都大学	博士（薬学）	氏名	東 佑翼
論文題目	3 座配位子を用いたタンパク質への金属スイッチ能の導入		
(論文内容の要旨)			
序論 外部刺激に応答する人工タンパク質の設計は、任意のタイミングでその構造や活性を制御することができることから、タンパク質工学における大きな目標の一つとなっている。その一例として、イミノ二酢酸(Ids)のような金属キレート能をもつ3 座配位子を適切な位置のアミノ酸側鎖に導入した非天然型ペプチドは、金属イオンに応答してその構造と機能がスイッチすることが報告されている。このような、金属イオン応答性タンパク質は、(i) 複雑な生命現象の中で、ただ一種類のタンパク質の操作を可能とするツールとして、また、(ii) タンパク質の部分的な構造変化を通してタンパク質の構造機能相関を解明するためのツールとして、さらに(iii) 生体内の金属イオンの検出ツールとして有用であると考えられる。 本研究では、このような分子デバイスとしての金属応答性タンパク質を創製することを目的とした。とりわけ、3 座配位子のペプチド鎖への新しい導入法を開発するとともに、設計したタンパク質の金属イオンに応答した構造変化について検討を加えることで、以下に示す金属応答性の人工タンパク質創出に関する重要な知見を得た。			
第一章 システイン残基のイミノ二酢酸(Ids)修飾によるコバルト(II)イオン応答性GCN4-bZIPタンパク質の創製 Idsを用いたペプチドの構造スイッチは実用的な手法であるものの、従来のペプチド鎖へのIdsの導入法は、リジン側鎖のアミノ基の修飾によるものであり、大腸菌発現系など遺伝工学的手法で得られるタンパク質へは応用できなかった。そこで、本スイッチシステムのタンパク質への応用を指向し、システイン残基のIds化を目的とした新規Ids化修飾化合物のTs-S-IDAを設計し、合成した。また、Ts-S-IDAを用いることで、タンパク質中の変異システイン残基を速やかにIds修飾することに成功した。さらに本手法を酵母転写調節因子GCN4由来のbZIPドメインに適用することで、その構造とDNA結合をコバルト(II)イオンによって制御することに成功した。本結果により、Idsを用いた金属スイッチが、合成ペ			

プチドのみならず大腸菌発現系で得られるタンパク質へも応用可能であることが示された。

第二章 タンパク質の金属スイッチを指向した新規金属結合ユニットとしてのジピコリルアミン(Dpa)

Idaの導入によるペプチドの構造スイッチの成功例は報告されているものの、その他の配位子を用いた構造スイッチ例の報告はほとんどない。そこで、Idaと同じ3座配位子であるジピコリルアミン(Dpa)を選択し、そのペプチド構造スイッチへの応用について検討した。Dpa構造のペプチド鎖への導入に関して、還元的アミノ化反応を応用することで、合成樹脂上で簡便に行う方法を開発した。Dpaを含むペプチドの一つは、ニッケル(II)イオンと検討したその他の2価の金属イオンで全く異なる応答性を示した。このような特定の金属イオン種のみに見られる応答性は、Idaの場合には観察されておらず、金属スイッチ系に新たな知見を与えた。またこれらの検討から、本ペプチドのニッケル(II)イオン選択的な検出ツールとしての可能性が示唆された。

以上のように、本研究では金属キレート能をもつ3座配位子のタンパク質への簡便な導入法を開発するとともに、配位子を導入したタンパク質の金属イオンに応答した構造・機能変化について検討を加え、タンパク質のDNA結合の制御とNi(II)選択的検出に成功した。これらの結果は、人工金属応答性タンパク質設計や、新機能の分子デバイスの開発に価値ある知見を提供すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

外部刺激に応答する人工ペプチドやタンパク質に関する研究は、タンパク質工学分野における重要な課題である。刺激応答性のスイッチをタンパク質に導入することは、様々な生命機能を制御するためのツールの創製を可能にするとともに、当該タンパク質の構造と機能との相関を知る上でも重要な手段となり得る。申請者は、ペプチド・タンパク質側鎖に金属イオンとの錯体形成能をもつ官能基を導入し、その金属イオンに応答した可逆的構造制御を目的とした研究により、以下に示す重要な知見を得た。

第一章では、申請者は、タンパク質への新しいイミノ二酢酸(Ids)基の導入法を開発することで、遺伝子組み換えタンパク質のIds修飾が容易に行えることを示した。さらに申請者は、この系を用いてDNA結合タンパク質であるbZIPタンパク質の*i*, *i*+2位にIds基を導入し、コバルト(II)イオンによってその構造とDNA結合を制御することに成功した。修飾タンパク質の精製、構造、純度解析、及びその可逆的構造・機能変化解析も的確であり、上記の結果は新しいIds修飾法とこれを用いたスイッチ系の有用性を示すものである。

第二章では、ジピコリルアミン(Dpa)基を金属スイッチの素子として選択し、ペプチドへの導入と金属スイッチ能解析について検討を行った。申請者は、ペプチド鎖をDpa修飾するための簡便な方法論を開発するとともに、Dpa構造を持つペプチドの金属イオンに応答した構造変化の解析から、ニッケル(II)イオンとその他の金属で応答性が異なるというユニークな特性を見出した。さらに、申請者は、この応答性の違いを利用し、ニッケル(II)イオンの選択的検出や、ペプチド構造の連続的・可逆的制御を達成した。

以上のように、申請者は、金属キレート能をもつ3座配位子のタンパク質への簡便な導入法を開発するとともに、配位子を導入したタンパク質の金属イオンに応答した構造・機能変化について検討を加え、タンパク質のDNA結合の制御とニッケル(II)の選択的検出への応用性を示した。得られた成果は修飾ペプチド・タンパク質の論理的な設計と的確な構造解析に基づくものであり、当該分野の発展に寄与する高度な成果である。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。
さらに、平成24年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降