

氏名	梶原 大介
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3150号
学位授与の日付	平成18年 3月24日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	FRET analysis of protein structures and functions using nonnatural amino acid mutagenesis (非天然アミノ酸変異導入法を用いたタンパク質構造・機能の FRET 分析)
論文審査委員	教授 宍戸 昌彦 教授 山田 秀徳 教授 中西 一弘

学位論文内容の要旨

近年の大規模なゲノム解析の結果、タンパク質をコードするさまざまな DNA 配列が同定されている。しかし、これらの情報から生理的条件下でのタンパク質の構造（フォールディング、複合体形成、翻訳後修飾）と機能（タンパク質相互作用、細胞内局在など）を予測することは困難である。これらタンパク質の構造と機能の解明が、生命システムの解明には非常に重要であり、これらを網羅的に解析できる技術が求められている。蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）は、非常に高い検出感度を持ち、クルド条件での測定が可能であることだけでなく、タンパク質構造のダイナミクスを詳細に検出することが出来るため、非常に強力なツールとなり得る。FRET 分析には、タンパク質へ2つの蛍光分子を標識しなければならない。しかし、化学修飾法では標識部位を特定することが困難であり、蛍光タンパク質融合法は目的タンパク質の機能を阻害してしまう場合がある。一方、本研究室ではタンパク質合成系を拡張することにより、非天然アミノ酸を部位特異的に導入する技術を開発している。また、最近可視領域に吸収をもつ幾つかの蛍光アミノ酸が合成された。これらを応用することにより、タンパク質への部位特異的な二重蛍光標識が可能であると考えられる。

このような背景の下、本研究では部位特異的非天然アミノ酸導入法を用いたタンパク質の構造、機能解析法を開発を行った。特に、蛍光ドナー、アクセプターとなる2つの蛍光アミノ酸をタンパク質の2箇所部位特異的に導入することにより、タンパク質のコンフォメーション変化や、フォールディング過程の分析を行った。二重蛍光標識カルモジュリンは、蛍光アミノ酸の導入位置を最適化することで、非常に高感度に基質の結合に伴うコンフォメーション変化の検出を行うことが出来た。また、二重蛍光標識 MBP5 を用いることにより、シャペロニンに依存したフォールディング過程の検出に成功した。

論文審査結果の要旨

本論文では種々の非天然アミノ酸を蛋白質の特定の位置に導入する手法を応用し、蛍光性蛋白質の蛍光色の改変や蛋白質ペプチド相互作用解析を行っている。序章につづく第1章では蛍光性蛋白質であるGFPについて、その発色基の一部である66位チロシンを種々の非天然アミノ酸に置換して蛍光発色波長の変化について調べている。その結果アミノフェニルアラニンやメチルチロシン置換GFPでは蛍光波長の青色移動が認められている。第2章ではカルモジュリンの2ヶ所に蛍光エネルギードナーやアクセプターとなる非天然アミノ酸を導入し、エネルギー移動(FRET)効率の変化からカルモジュリンのコンホメーション変化を検出することに成功している。とくにカルモジュリン結合ペプチドを添加後のコンホメーション変化を実時間で追跡できることを世界で始めて証明している。さらに第3章ではシャペロニン蛋白質中にエネルギードナー-アクセプター対をもつ基質蛋白質を導入し、そのFRET効率の変化から基質蛋白質のまき戻り過程を実時間で追跡することにも成功している。このように本論文では非天然アミノ酸導入法によって位置特異的に蛍光基を導入することによって、蛋白質の新しい解析手法が提供できることを証明した。これらの結果は将来の医療診断などへ応用が可能であり、生物工学的に興味深く、また独創性の高い研究であると評価される。以上の結果より、本論文は博士(工学)に十分値するものと判定される。