

博士論文の内容の要旨

氏名	入間川 伸
学位名	博士 (工学)
学位授与年月日	2022年 3月 20日
論文題目	高安定・高機能人工蛋白質の開発に関する研究

(博士論文の内容の要旨)

生物は、蛋白質、核酸、糖、脂質等の様々な生体分子の集合体から構成されており、多くの生体分子どうしが互いに相互作用することによって複雑な生命活動が営まれている。なかでも蛋白質は、20種類のL-アミノ酸が多数重合したポリペプチド鎖から構成される機能性生体高分子である。また、複数のポリペプチド鎖が適切に折りたたまれて会合することも多く、複雑かつ洗練されたナノスケールの超分子複合体構造を形成することで、多様かつ高度な機能を発揮することができる。近年、遺伝子工学技術の発展によって、蛋白質は有用な機能性分子として、洗濯洗剤に添加される酵素やバイオ医薬品等、応用が進んできている。蛋白質工学は、蛋白質についてこれまで得られた知見を基に、蛋白質の安定化や高機能化、さらには天然に存在しない構造や機能を持つ人工蛋白質を設計創出することを目標とする研究領域である。しかしながら、蛋白質の折りたたみや複合体形成には非常に多くの相互作用が関係しているために、アミノ酸配列の莫大な順列組み合わせの中から安定な構造や優れた機能を持つ人工蛋白質や人工蛋白質複合体を見出すことは依然として困難な課題である。

これまでの先行研究により、新規人工蛋白質 WA20 を利用した人工蛋白質複合体である蛋白質ナノブロックが開発されてきた。WA20 は特徴的な柱状 2 量体構造を形成することから、他の多量体蛋白質と融合することによって多様な自己組織化ナノ構造複合体を形成することに適している。そこで、本研究では、新規人工蛋白質 WA20 を基にして、高安定人工蛋白質及び高機能人工蛋白質複合体の開発を目的とした。

第 1 章では、本研究の意義を明確にするために、研究の背景及び目的についてまとめた。

第 2 章では、MD シミュレーションを用いた予測に基づき、合理的に人工蛋白質 WA20 の熱安定化変異体を開発した研究について報告した。熱安定化変異予測に基づき、7 つの WA20 変異体を作製した。円偏光二色性 (CD) スペクトル測定を用いた熱変性試験の結果から、3 つの変異体 (N22A, N22E, H86K) において変性中点温度 (T_m) の向上が確認された。次にこれらの安定化変異を組み合わせる WA20 に導入したところ、 T_m が最大で 10.6 °C 向上した。さらに、これらの熱安定化変異を先行研究で開発された熱安定性変異体 Super WA20 (SUWA) に追加導入したところ、SUWA の T_m がさらに最大 4.3 °C 向上し、129.0 °C の T_m を持つ超熱安定な人工蛋白質の開発に成功した。さらに、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱 (SEC-MALS) や小角 X 線散乱 (SAXS) を用いて、これらの熱安定性変異体の会合状態や溶液構造を解析した。

第 3 章では、第 2 章で開発した熱安定化変異体の一種 WA20(H86K) を糖鎖結合蛋白質であるレクチンと融合することにより、糖鎖に対する結合力を増強した高機能人工蛋白質としてレクチンナノブロック複合体を開発した研究について報告した。具体的には、WA20(H86K) と β -ガラクトシド糖鎖を認識するヤナギマツタケ由来 2 量体ガレクチン *Agrocybe cylindracea* galectin (ACG) を様々な長さのペプチドリンカーにより連結したレクチンナノブロック WA20-ACG を開発した。SEC-MALS や SAXS の結果から、WA20-ACG は 2 の倍数量体の複合体を形成し、リンカーの長さを短くすることによって 4 量体以上の複合体の形成が促進されることが示唆された。WA20-ACG の糖鎖に対する特異性や親和性を糖鎖マイクロアレイや赤血球凝集試験、標的糖鎖を発現する細胞の蛍光染色試験等により評価したところ、WA20-ACG は、ACG と同様の標的糖鎖に結合し、親和性は ACG と比較して顕著に向上していることが示唆された。さらに表面プラズモン共鳴 (SPR) の結果から、WA20-ACG 複合体は会合数が多い複合体ほど多価結合効果によって糖鎖に対する結合力 (avidity) が向上し、ACG と比較して最大で約 80 倍程度、見かけの解離定数 ($K_{D,app}$) が改善されることが示唆された。これらの結果より、レクチンナノブロックによる複合体化は、レクチンの糖鎖結合力を高める有用な戦略であると考えられる。

本研究では、まず、MD シミュレーションを用いて新規人工蛋白質 WA20 及び SUWA を合理

的に安定化することに成功した。さらに、開発した WA20 の熱安定化変異体の一種を用いて、高機能人工蛋白質として、レクチンナノブロック WA20-ACG 複合体の開発に成功した。以上の成果により、高安定・高機能な人工蛋白質の開発研究に寄与するとともに、今後さらなる発展につながることを期待される。