

論文内容の要旨

博士論文題目

網羅的アラニン挿入変異解析を用いたジヒドロ葉酸還元酵素の
構造形成および機能発現機構の研究

氏 名 芝 るみ

(論文内容の要旨)

蛋白質の固有の立体構造や特異的機能は、アミノ酸配列に記述されている。アミノ酸配列に記述された情報を解読することは、第2の遺伝暗号解読問題と呼ばれ、ポストゲノム時代の蛋白質科学の最重要課題の一つである。しかし、アミノ酸配列には構造や機能に寄与しない余分な情報が含まれるため、我々は未だその解を得るに至っていない。本研究は、蛋白質構築原理の解明を目的とし、アミノ酸配列の連結性に着目した。配列分断のために、網羅的アラニン挿入という新規の手法を考案して、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)に対して適用したものである。

DHFR は、159 個のアミノ酸からなり、アラニンを 14 個含んでいる。したがって、可能なアラニン挿入変異体の数は、145 個となる。これらすべてのアラニン挿入変異体を作製し、挿入が構造及び機能に与える影響を、それぞれ溶解性、トリメトプリム (TMP) 耐性試験によってスクリーニングした。また、溶解性および TMP 耐性が構造形成、機能発現のよい指標となっていることを、任意に選んだ変異体を精製し、円二色性スペクトル、酵素活性の測定により、検証した。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) 構造形成のために、アラニン挿入を受け入れることができない領域が 12 領域、アミノ酸配列上に出現した。この領域へのアラニン挿入変異体は、野生型と異なり、非天然様 CD スペクトルを示した。この領域を構造エレメントと定義した。
- 2) 機能発現のために、アラニン挿入を受け入れることができない領域が 12 領域、アミノ酸配列上に出現した。この領域への挿入変異体は、酵素活性を示さなかった。この領域を機能エレメントと定義した。
- 3) 機能エレメントの大部分は構造エレメントに含まれており、構造形成が、機能発現にも必須であることを示している。しかし、一部については構造エレメントに含まれない機能エレメントや機能エレメントを含まない構造エレメントが存在した。
- 4) 折り畳み初期に形成される部位は、全て構造エレメントに含まれていた。
- 5) 構造エレメントは二次構造要素とは無関係であり、蛋白質内部での相互作用を担っていることが示唆された。
- 6) モジュール仮説を、エレメントにより合理的に説明することができた。

以上の結果、蛋白質は、構造エレメント、機能エレメントおよびそれらをつなぐリンカー領域から構成されるという、新規の蛋白質構築原理を提唱した。また、網羅的アラニン挿入変異は、どのような蛋白質にも適用することができる新規の研究手法であることを明らかにした。

(論文審査結果の要旨)

蛋白質の固有の立体構造や特異的機能は、アミノ酸配列に記述されている。アミノ酸配列に記述された情報を解読することは、第 2 の遺伝暗号解読問題と呼ばれ、ポストゲノム時代の蛋白質科学の最重要課題の一つである。本論文では、この問題に網羅的アラニン挿入という方法を用いて取り組んでいる。得られた成果は以下のとおりである。

1. 構造形成や機能発現のためにアラニン挿入できない場所が、アミノ酸配列中に連続した領域として出現した。それぞれ異なる 12 個の領域が同定された。構造形成のためにアラニン挿入を受け入れない領域を構造エレメント、機能発現のためにアラニン挿入を受け入れない領域を機能エレメントと定義した。
2. 機能エレメントの大部分は構造エレメントに含まれており、構造形成が、機能発現にも必須であることを示している。しかし、一部については構造エレメントに含まれない機能エレメントや機能エレメントを含まない構造エレメントが存在した。
3. 折り畳み初期に形成される部位は、全て構造エレメントに含まれていた。構造エレメントは二次構造要素とは無関係であり、蛋白質内部での相互作用を担っていることが示唆された。
4. モジュール仮説を、エレメントにより合理的に説明することができた。

以上の結果、蛋白質は構造エレメント、機能エレメントおよびそれらを連結するリンカー領域から構成されるという新規な蛋白質構築原理を提唱した。また、網羅的アラニン挿入が新規な蛋白質構築原理研究のための有効な手法であることを示した。

以上のように、本論文では、網羅的アラニン挿入が、アミノ酸配列情報の解読に有用であることを示すばかりでなく、新たな蛋白質構築原理を提唱している。これらの結果は、エレメントの組み合わせにより、新しい機能性蛋白質材料の創成や蛋白質を原因とする疾病の克服への展開にもつながると期待されるものである。本論文は、生物物理学的、蛋白質科学的、蛋白質工学的に重要であり、学術的価値が高い。よって、審査員一同は本論文が博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。