

Title	非天然アミノ酸の導入による糖結合タンパク質の人工機能化に関する研究
Author(s)	伊藤, 康高
Citation	
Issue Date	2013-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/11560
Rights	
Description	Supervisor: 芳坂 貴弘, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	伊藤 康高		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 336 号		
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 24 日		
論文題目	非天然アミノ酸の導入による糖結合タンパク質の人工機能化に関する研究		
論文審査委員	主査 芳坂 貴弘	北陸先端科学技術大学院大学	教授
	高村 禅	同	教授
	藤本 健造	同	教授
	松村 和明	同	准教授
	久野 徹	産業技術総合研究所	主任研究員

論文の内容の要旨

レクチンは糖鎖を認識するタンパク質であり、その種類、基質結合特異性の多さから糖鎖を解析するツールとして用いられている。またレクチンに様々な機能性化合物を化学修飾したものが報告されている。本研究では、非天然アミノ酸導入技術を利用して、レクチンの機能化を行った。具体的には、機能的な側鎖をもつ非天然アミノ酸をレクチンへ導入することで、糖基質の結合を蛍光変化として検出することや、糖基質を強固に結合することなどの、新たな機能を持ったレクチンの合成を試みた。

第 2 章では、蛍光標識アミノ酸を部位特異的に導入したレクチンの合成を試みた。蛍光標識アミノ酸として BODIPY-FL を結合した aminophenylalanine (BFLAF) をシアル酸結合レクチン(SRC) にアンバーコドン法で導入し、基質の結合によって蛍光が変化を示すことを明らかにした。蛍光スペクトル測定では糖結合部位周辺の選択された 8 部位それぞれで、基質結合に伴って蛍光強度は増加し、その変化の度合いは部位によって異なっていた。特に Thr168 に BFLAF を導入した場合の蛍光変化は 3.7 倍となった。しかしその結合能力は野生型のものよりも弱くなっていた。この蛍光変化のメカニズムを調べるために、Thr168 部位に BFLAF を導入した SRC の糖結合部位の Trp161 を Phe に置換した場合の蛍光変化を観察した。その結果、W161F 変異体は置換していない場合と比較して蛍光変化が抑制されていた。さらに詳細な蛍光特性を調べるために蛍光寿命測定を行った。その結果、短寿命と長寿命の 2 成分が検出され、この 2 成分を基質結合前と結合後と比較した所、結合前に観察された短い寿命の成分比が、基質結合後には減少していた。このことから、BFLAF 導入 SRC の基質結合に伴う蛍光変化は、Trp の消光の解消を含む BFLAF の周辺環境の変化によって起こっていると結論づけた。これらの結果より、蛍光標識非天然アミノ酸を部位特異的に導入する方法によって、レクチンと糖との結合を蛍光変化によって検出できることを示した。

第 3 章では、第 2 章で述べた蛍光標識レクチンのレパートリーを増やすため、ガラクトース結合レクチン(hGal-1)に BFLAF をアンバーコドン法で導入し、基質結合に伴う蛍光変化の検出を試みた。糖結合部位周辺を含む 11 部位に BFLAF を導入した hGal-1 は全て合成が確認できた。蛍光

スペクトル測定では Ala1 に BFLAF を導入した hGal-1 が基質であるラクトースを添加した場合に有意な蛍光変化を示した。また蛍光寿命測定では短寿命と長寿命の 2 成分を検出され、基質の結合によりわずかに短寿命の成分比の減少が見られた。以上の結果より、蛍光標識非天然アミノ酸の導入による蛍光レクチンプローブの合成が、他のレクチンへ適応可能であることを示すことができた。

第4章では、糖結合タンパク質と基質との弱い結合を強固に結合させて検出することを目的として、光クロスリンクアミノ酸と蛍光標識アミノ酸の糖結合タンパク質への二重導入を行った。蛍光標識アミノ酸 TAMRA-X-aminophenylalanine と光クロスリンクアミノ酸 *p*-benzoylphenylalanine を N 末端部位にアンバーコドン、Tyr210 位もしくは Tyr341 位に4塩基コドン CGGG に対応させて 2 重導入したマルトース結合タンパク質(MBP)を合成した。この MBP に基質としてマルトヘキサオースおよびアミロースを添加し、365nm の光を照射し光クロスリンク反応を行った。その結果、SDS-PAGE の蛍光イメージにおいて、Tyr341 部位に Bpa を導入した場合に、アミロース存在下で 50%まで MBP のバンド強度が低下して、光クロスリンク生成物と思われる高分子量のバンドが検出された。これはアミロースと光クロスリンク反応によって複合体を形成したことを示唆している。また Tyr210 でもアミロース存在下でバンド強度の低下が見られたが、その効率は Tyr341 より低かった。これらの結果から、光クロスリンクアミノ酸と蛍光標識アミノ酸の二重導入により、糖結合タンパク質と糖基質の光クロスリンクとその蛍光による検出が可能であることを示した。

以上の結果より、部位特異的に非天然アミノ酸を導入した糖結合タンパク質が、基質となる糖との結合を蛍光変化として検出できることや、糖との複合体を光クロスリンクさせて複合体として検出できることなど、従来の糖結合タンパク質ではできなかった解析を可能にすることを示した。これらの成果は、糖結合タンパク質を糖鎖認識プローブとして応用する上で有用な知見となる。今後、このような部位特異的に非天然アミノ酸を導入した糖結合タンパク質が、糖鎖解析のためのツールとして活用されることが大いに期待されるだろう。

論文審査の結果の要旨

本研究では、重要な生体機能に関わるレクチンなどの糖結合タンパク質に対して、非天然アミノ酸導入技術を用いることで、基質結合の検出や、基質との光クロスリンクなどの人工機能を付与することが試みられた。

まず、シアル酸結合レクチンに着目して、その基質との結合を蛍光により検出することが行なわれた。シアル酸は細胞表面糖鎖の末端に存在して様々な細胞機能に関与しており、その蛍光検出はシアル酸を含む糖鎖の機能を調べる上で有用となる。実験では、Earthworm 由来のラクトース結合レクチン変異体であるシアル酸結合レクチンに対して、基質結合部位近傍の 8 ヶ所のアミノ酸部位に、蛍光基 BODIPYFL を付加した非天然アミノ酸(BODIPYFL-aminophenylalanine)が導入され蛍光が測定された。その結果、いくつかの導入部位について、基質の結合により蛍光強度が 3 倍以上に増加することが見出された。これは、基質非結合時には基質結合部位に存在するトリプト

ファン残基によって BODIPYFL の蛍光が消光されるが、基質の結合によりトリプトファン残基が BODIPYFL から離れて蛍光消光が解消されるためだと推測された。これは、当該トリプトファン残基をフェニルアラニンに置換したところ蛍光変化が小さくなったことから裏付けられた。また、ガラクトース結合レクチンであるガレクチンについても、同様の検討が行なわれた。ガレクチンは免疫系や細胞の分化に関与しており、その蛍光検出は糖鎖の有用な解析手法になると期待される。基質結合部位近傍の 11ヶ所のアミノ酸部位について、BODIPYFL 標識アミノ酸が導入され、そのうち N 末端部位に導入した場合には基質の結合により蛍光強度が 1.5 倍に増加することが見出された。これらの結果は、様々なレクチンについて、本手法が適用できる可能性を示すものである。

さらに、糖結合タンパク質に光クロスリンク分子を有する非天然アミノ酸を導入することで、糖基質を強固に捕捉する機能を付与することが試みられた。今回はマルトース結合タンパク質をモデルとして用いて、その基質結合部位近傍にベンゾフェノンを有する非天然アミノ酸を導入しつつ、蛍光標識のために N 末端部位に TAMRA 標識アミノ酸が導入された。糖基質存在下で光照射を行ない、SDS-PAGE の蛍光検出により生成物を分析した結果、光クロスリンク産物と推測される生成物が確認された。レクチンなどの糖結合タンパク質と糖基質との結合は一般的に弱く、タンパク質に結合した糖基質を単離して分析することが困難な場合が多い。そのため糖結合タンパク質と糖基質を光でクロスリンクすることのできる本手法は、糖基質の分析において有用な手法となると期待される。

以上、本論文は糖結合タンパク質に対して、基質結合の蛍光検出機能や光クロスリンク機能を付与することが可能であることを実証したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として十分価値あるものと認めた。