

氏 名	テン ノ ナ ツ コ 天 野 名 都 子
学 位 の 種 類	博士（工学）
学 位 記 番 号	論博第278号
学位授与の日付	平成24年6月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当 論文博士
学 位 論 文 題 目	PRESAT-vectorの開発と蛋白質ドメイン研究への応用

論文審査委員	主 査	教 授	田 中 俊 樹
		教 授	神 取 秀 樹
		准教授	出 羽 毅 久
		教 授	廣 明 秀 一（名古屋大学）

論文内容の要旨

2003年にヒトゲノムの完全解読完了が宣言された。その後、現在までに多くの生物のゲノムDNAが解読され、遺伝子の配列情報の蓄積が急速に進んだ。これらのデータベースのゲノム情報を利用してPCRを用いて目的遺伝子をクローニングし、組換え蛋白質を調製し、構造や機能についての研究が容易に行えるようになった。研究に用いる組換え蛋白質を得る方法としては、大腸菌、昆虫、動物細胞を利用する系、細胞抽出物を用いた無細胞発現系などがあるが、コストの面や扱いやすさなどから、多くの場合、大腸菌による系が第一選択肢である。しかし、すべての遺伝子が、大腸菌で可溶性蛋白質として発現可能なわけではない。そのため、研究に用いる蛋白質を得るためには、複数のベクターを作製し、大腸菌における発現効率、溶解度、安定性、活性などを評価する必要がある。

そこで、発現ベクターの作製にかかる時間を短縮し、研究を効率化するツールとして、方向性を持ってPCR産物をクローニングできるTベクター、PRESAT-vector (Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T-vector)を開発した。PCR産物を簡便にクロ

ーニングする方法として T-ベクター法があるが、この方法はクローニングの方向性が無いため、蛋白質発現系構築には向かない。PRESAT-vector により多サンプルの発現系構築を同時に行うことができ、研究に用いる蛋白質サンプルの調製が容易になった。

PRESAT-vector の応用として、蛋白質を細胞内へ導入する PTD (protein transduction domain) と、細胞内の蛋白質を Tb³⁺ の蛍光を利用して観察するためのタグ LBT (lanthanide-binding tag) を融合させる蛋白質発現系を構築した。LBT/PTD 二つのタグを持つ蛋白質は、PTD の活性により生きた動物細胞に入ることができ、その局在は、Tb³⁺ の蛍光で観察することができる。また、新規の PTD 活性をもつペプチドとして、ヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質(IGFBP)由来のペプチドを同定した。これまでに知られていた PTD 活性をもつペプチドは、HIV 由来の TAT に代表されるようにウイルス由来のものが多く、IGFBP はヒト由来であることから、薬物送達システムとしての臨床応用にも期待できる。

さらに、PRESAT-vector の高効率かつ高速な蛋白質発現ベクター構築能を生かして、立体構造解析に適した様々な蛋白質ドメインの試料を調製し、その構造と機能の解析を行った。まず、神経ホルモンの一つである、血管作動性ペプチド(Vasoactive internal peptide, VIP)の膜を模倣した環境での構造を決定した。VIP やその類似体は、炎症性疾患の治療やがん診断に役立つと考えられている。今回決定した構造は、それらの研究において有用なデータである。

次に、AAA-ATPase の一つである Nuclear Valosin-containing Protein-like 2 (NVL2) の N 末端ドメインの立体構造を決定し、このドメインが nucleolin の連続する二つ以上の RNA 結合ドメインに結合すること、細胞内では核・核小体に局在することを明らかにした。また、他の Type II AAA-ATPase との類似性から、NVL は nucleolin-RNA 複合体を解離させ、リボソーム生合成を促進するというメカニズムを提案した。

最後に、細胞接着因子 Zonula occludens-1 (ZO-1) の第一 PDZ ドメインの NMR シグナルの帰属を行った。タイトジャンクションを形成する因子の中心的な相互作用の一つが ZO-1 の第一 PDZ ドメインと、claudin の細胞内 C 末端 PDZ 結合モチーフによるものである。また、この PDZ ドメインはリン脂質とも直接相互作用していることが明らかとなっている。これらの相互作用が果たす役割を研究するためには、この帰属データが有用である。

以上のように、PRESAT-vector を利用した方向性を持った PCR クローニングの技術は、研究に適した組換え蛋白質を効率よく得るための簡便かつ強力な手法であり、今後の蛋白質研究においても広汎な応用展開が可能である。

論文審査結果の要旨

2003年にヒトゲノムが完全に解読されて以来、多くの生物のゲノムDNAの配列情報の蓄積が急速に進み、これらのゲノム情報からPCRを用いて目的遺伝子をクローニングし、組換え蛋白質を調製し、構造や機能についての研究が容易に行えるようになった。現在、組換え蛋白質を得る方法として、コストの面や扱いやすさなどから大腸菌による系が第一選択肢である。しかし、研究に用いる蛋白質を得るためには、複数のベクターを作製し、大腸菌における発現効率、溶解度、安定性、活性などを評価する必要がある。

現在、クローニングの方法としてT-ベクター法があるが、この方法はクローニングの方向性がなかった。そこで、申請者は方向性を持ってPCR産物をクローニングできるT-ベクター、PRESAT-vector (Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T-vector)を開発した。申請者はPRESAT-vectorを用いることで、多サンプルの発現系構築を同時に行い、研究に用いる蛋白質サンプルの調製を容易にできるようにした。

申請者は、先ず第1章で序論として上記に述べた遺伝子のクローニングについて説明し、従来法の問題点を挙げ示した。

第2章では遺伝子のクローニングにおけるPRESAT-vectorの意義と作成法を述べた。数種類の実例を示す、遺伝子のクローニングを簡便に且つ効率が良く行うことができ、従来法より優れている点を明らかにした。

第3章では、PRESAT-vectorを利用して、蛋白質を細胞内へ導入するPTD (protein transduction domain) と、Tb³⁺の蛍光を利用して観察するためのLBT (lanthanide-binding tag)を融合させる蛋白質発現系を迅速、かつ簡便に構築した。LBT/PTD二つのタグを持つ蛋白質は、動物細胞内での局在化を蛍光で観察することができる。申請者はこの研究から、新規のPTD活性を持つペプチドとして、ヒトインシュリン様成長因子結合蛋白質(IGFBP)由来のペプチドを同定した。これまでに知られていたPTD活性をもつペプチドは、HIV由来のTATに代表されるようにウイルス由来のことが多い。IGFBPはヒト由来であることから、薬物送達システムとしての臨床応用にも期待できる。

第4章で、PRESAT-vectorの高効率かつ高速な蛋白質発現ベクター構築能を生かして、立体構造解析に適した様々な蛋白質ドメインの試料を調製し、その構造と機能の解析を行った。まず、神経ホルモンの一つである、血管作動性ペプチド(VIP)の膜を模倣した環境での構造を決定した。次に、AAA-ATPaseの一つであるNuclear Valosin-containing Protein-like 2 (NVL2)のN末端ドメインの立体構造を決定し、このドメインがnucleolinのRRMドメインに結合すること、細胞内では核・核小体に局在することを明らかにした。最後に、細胞接着因子Zonula occludens-1 (ZO-1)とそのリガンドClaudinとの結合様式を明らかにするために、ZO-1のPDZドメインのNMRによる立体構造解析を行った。

このように、PRESAT-vectorを利用した方向性を持ったPCRクローニングの技術は、組換え蛋白質を効率よく得るための簡便かつ強力な手法であり、今後の蛋白質研究においても広汎な応用展開が可能である。以上、本論文の結果は学術雑誌6報に掲載されており、学術的に高い価値を持つと判断される。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として十分な価値があると認められる。