

## 論 文 内 容 要 旨

報 告 番 号	甲 創 第 36 号	氏 名	小宮 千明
学位論文題目	Studies on development of amide cleavage systems applicable to protein manipulation (タンパク質機能解明を指向したアミド結合切断システムの開発研究)		
<p><b>【背景】</b></p> <p>タンパク質は様々な生命現象に関与しており、その機能解明は生命現象の理解や新規創薬標的の発見に繋がるのが期待される。このため、タンパク質の活性を外部から制御するための手法や機能性部位を導入したタンパク質の調製法といった、タンパク質機能を解析するための方法の開発が求められている。そこで本研究では、そのような方法論の開発を目指し、生体内のアミド結合切断反応に着目した。アミド結合はその二重結合性から求核剤に対する安定性が高く、これを化学的に切断するには一般的に過酷な条件を要する。一方で生体内には、この化学的に安定なアミド結合を生理的条件下切断するシステムが多く存在する。このような生体内の精巧なシステムに魅力を感じ、その模倣・利用を通じてタンパク質機能解明に向けた方法論の開発が可能ではないかと考え、研究に取り組んだ。</p> <p><b>【方法・結果】</b></p> <p>まず、タンパク質の活性を外部から制御するための手法として、刺激応答性アミド結合切断デバイスを開発した。分子の設計にあたっては、アミド結合の切断-再形成を伴うタンパク質自己編集システムであるプロテインスプライシングに着目した。本システムにおけるアミド結合切断反応を化学的に模倣することで、生理的条件下アミド結合切断反応を誘起する人工アミノ酸の開発に成功した。さらに本分子に対して紫外線応答部位を導入することで、外部刺激によるアミド結合切断反応の制御が可能であることを見出した。</p> <p>続いて、機能性部位を有するタンパク質調製技術の更なる拡充を目指し、新規チオエステル合成法を開発した。チオエステルはタンパク質合成における重要な合成中間体であり、その実用的な調製法の開発が求められている。ここでは、C末端加水分解酵素であるカルボキシペプチダーゼ Y に着目した。セリンプロテアーゼに分類される本酵素は、エステル中間体を経てタンパク質 C 末端のアミド結合を切断する。このエステル中間体を適切な求核剤で捕捉することで、アミド結合の切断を伴う形で C 末端チオエステルを得ることが可能であることを見出した。本反応を用いることで、従来法では困難であった C 末端アミノ酸を含む、多様な末端アミノ酸のチオエステルを合成可能であった。さらに、開発した反応は発現タンパク質へも適用可能であり、本反応を利用し機能性部位としてビオチンや蛍光色素を有するタンパク質の合成に成功した。</p>			