

氏名	中田 秀孝
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3906号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Static and dynamic fluorescence analysis of biomolecular interactions (生体分子間相互作用の静的および動的蛍光法による解析)
論文審査委員	教授 宍戸 昌彦 教授 山田 秀徳 教授 中西 一弘 准教授 大槻 高史

学位論文内容の要旨

Incorporation of various nonnatural amino acids into proteins has been carried out in several laboratories. However, nonnatural amino acids with large aromatic groups, such as fluorescent groups, are not always efficiently incorporated into proteins in the *Escherichia coli* cell-free translation system. Since incorporation of large amino acids is essential for various applications of nonnatural mutagenesis, analysis of factors that determine allowed sizes and shapes of amino acids is crucial. One factor which may determine the incorporation efficiency is a reduced binding efficiency to elongation factor Tu (EF-Tu) in tRNAs carrying large amino acids. We reported a novel and simple method to observe the binding of EF-Tu to aminoacyl-tRNAs that carry fluorescent amino acids, and evaluated the binding constants between *Escherichia coli* EF-Tu and tRNAs charged with BODIPY FLC5-aminophenylalanine (BFL5AF) and 9-anthrylalanine (9antAla).

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a powerful tool for studying interactions among biomolecules at the single-molecule level in solution. The observed data can be interpreted by the changes in molecular weights or molecular conformations associated with the binding to other molecules. To demonstrate the suitability of position-specifically labeled protein for analysis of interactions, we analyzed protein-protein and protein-DNA interactions by using position-specifically labeled protein with FCS.

We reported novel substrates for protease activity evaluation by FCS. Short peptides with a tryptophan or other fluorophore-quencher pair can be used to detect substrate cleavage, where cleavage is monitored by the fluorescence intensity increase following quencher release. However, peptide substrates often show limited solubility and cause undesirable aggregations that may lead to incorrect conclusions. The introduction of a large-sized fluorophore-quencher pair may boost these solubility problems and possibly impede protease access. In this study, we developed novel protein substrates with a fluorophore at a specific position by a cell-free translation system with an expanded genetic code. We attempted to detect the activity of caspase-3 and matrix metalloproteinase (MMP)-9 using fluorescently labeled substrates and FCS. To demonstrate the suitability of our FCS-based assay for screening, various chemical compounds were screened for MMP-9 inhibitors. The combination of the protein substrate and FCS will be quite suitable for detecting activities of several proteases.

論文審査結果の要旨

本論文は5章から構成されている。第1章では生体分子の解析に用いられる種々の蛍光法、すなわち蛍光共鳴エネルギー移動法や蛍光消光法による静的な分子間相互作用の検出、また蛍光相関分光法（FCS）による動的な相互作用の検出について概説している。これらの手法を有効に利用するための蛋白質位置特異的標識法である、蛍光性アミノ酸の4塩基コドン導入法について説明している。

第2章では、蛍光性アミノアシル tRNA の加水分解速度を種々の濃度の EF-Tu 共存下で測定し、種々の蛍光性アミノ酸を担持した tRNA と EF-Tu との解離定数を求めている。その結果、大きな蛍光基をもつ非天然アミノ酸でアミノアシル化された tRNA は EF-Tu との結合が抑制されることを見いだしている。これが、大きな非天然アミノ酸が蛋白質に導入されにくい原因の一つであると述べている。

第3章ではFCS法による蛋白質-DNA相互作用の検出について述べている。DNA結合蛋白質の特定の位置に蛍光基を導入しFCS測定すると、DNA共存下では、明確に蛋白質の動きが抑制された。この結果からDNA結合蛋白質-DNA相互作用の解離定数が算出された。

第4章ではFCSを利用した蛋白質分解酵素阻害剤の探索を行った。特に本研究では蛋白質N末端に標的ペプチドフラグメントを結合し、さらにそれに蛍光基を導入することによって、実際の蛋白質分解に近い条件下での探索を可能にしている。化合物ライブラリーから実際に阻害剤を探索した結果、とくに阻害効果が大きなものが見いだされた。これはすでに阻害剤として発表されているものであり、この方法の有効性を実証することができた。第5章ではこれらの成果をまとめている。

このように、本研究では静的および動的蛍光法と位置特異的蛋白質蛍光標識法を駆使することによって、種々の分子間相互作用を検出し、また新規薬物探索法を提案している。これらの成果は工学への応用が広く期待されるものであり、博士（工学）の学位にふさわしいものと認められる。