京都大学	博士（工　学）	氏名	藤島　祥平
論文題目	Development of Protein Labeling Methods for Functional Analyses in Biological Conditions （生理環境での機能解析を指向したタンパク質修飾法の開発）		

（論文内容の要旨）

タンパク質は生体内で多岐にわたる役割を担っているが、夾雑な細胞内でタンパク質の機能を解析出来る手法は未だ不十分と言える。本論文は、生細胞内の様な夾雑な環境下でも標的タンパク質を人工小分子により選択的に標識可能な手法を開発し、その手法により標識したタンパク質の機能や細胞内での局在等を詳細に解析した結果をまとめたものであって、３章から成っている。

第一章では、生体直交性の高い短鎖のペプチドタグに対して選択的に相互作用する人工小分子を開発し、タンパク質の機能を選択的に抑制する技術への応用を行った。アスパラギン酸４連続配列ペプチドと相互作用する人工小分子を等温滴定カロリメトリー(ITC)により探索した結果、チロシンを基本骨格とした二核のニッケル(II)錯体（Ni(II)-DpaTyr）がこのペプチドと強固に結合することを新たに見出した。この Ni(II)-DpaTyr と相互作用するペプチドの配列依存性を ITC 測定により詳細に検討した結果、アスパラギン酸３連続配列ペプチドタグ（D3-tag）が Ni(II)-DpaTyr と１：１で強固に結合することを明らかにした。さらに、この相互作用ペアの認識部位を二量化した$(D3)_2$-tag/Ni(II)-DpaTyr dimer ペアの親和性を蛍光滴定実験により評価した結果、抗原抗体反応に匹敵する非常に高い親和性を示した(K_d = 500 pM)。この Ni(II)-DpaTyr dimer はタンパク質上に融合標識した$(D3)_2$-tag に対しても選択的かつ非常に強固に結合することを蛍光滴定実験により実証し、さらに光増感剤を修飾した Ni(II)-DpaTyr dimer プローブを用いて、大腸菌破砕液中に含まれる$(D3)_2$-tag 融合βガラクトシダーゼの酵素活性を光照射により選択的に抑制可能であることを明らかにした。

第二章では、ヒスチジン連続配列ペプチドタグ(His-tag)と水中で安定に相互作用する新規の金属錯体を開発し、蛍光イメージング技術への応用を行った。His-tag はニッケル(II)錯体 Ni(II)-NTA と選択的に結合する性質を利用して、生きた細胞でのタンパク質の機能や局在変化を観測する蛍光イメージング技術などに応用されてきた。しかしながら、Ni(II)-NTA を用いた蛍光イメージング法は、ニッケルイオンの強い色素消光性によるイメージング感度の低下と発癌毒性が常に問題視されていたため、Ni(II)-NTA に代わる新しい人工小分子の開発が求められていた。そこで、His-tag と相互作用する人工小分子を ITC 測定により探索した結果、新規の亜鉛(II)錯体（Zn(II)-Ida）を開発した。そして、Zn(II)-Ida は認識部位を多量化することにより、従来の Ni(II)-NTA 錯体よりも His-tag と安定に結合することを ITC 測定に

京都大学	博士（工　学）	氏名	藤島　祥平

より明らかにした。この Zn(II)-Ida 錯体に蛍光色素を連結した蛍光プローブ分子を有機合成し、従来の Ni(II)-NTA 型の蛍光プローブと蛍光量子収率に関して比較した結果、Zn(II)-Ida 型の蛍光プローブが５倍高い値を示した。この Zn(II)-Ida 型蛍光プローブにより哺乳類細胞膜上で発現させた His-tag 融合 G-タンパク質共役型受容体を標識して共焦点レーザースキャン顕微鏡(CLSM)で解析した結果、従来の Ni(II)-NTA 型プローブよりも標的タンパク質を高感度に蛍光イメージング出来ることを実証した。

第三章では、細胞に内在的に発現しているタンパク質の選択的ラベル化が可能な新規タンパク質修飾法を開発した。具体的には、標的タンパク質に対するアフィニティーリガンドと色素等のプローブ分子を、求電子活性を有するアシルイミダゾール誘導体で連結したラベル化剤を用いて、標的タンパク質とラベル化剤との相互作用により誘起されるアシル転移反応により標的タンパク質を選択的かつ効率的に化学修飾する新規タンパク質修飾法、リガンド指向型アシルイミダゾール化学(LDAI 化学)を開発した。LDAI 化学は、標的タンパク質であるヒト由来炭酸脱水酵素(CA)の機能を阻害することなく、タンパク質の活性中心近傍を部位選択的かつ効率的に修飾可能であることを SDS-PAGE や MALDI-TOF MS による解析から明らかにした。また LDAI 化学は、CA のみならず、FK506 binding protein 12 (FKBP12)やジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の試験管内でのラベル化にも適用出来る高い汎用性が実証された。さらに、生細胞表層に内在的に発現する葉酸受容体(FR)を LDAI 化学により修飾を試み、SDS-PAGE および Western blotting で評価した結果、FR を高選択的に化学修飾可能であることを明らかにした。このラベル化された FR を CLSM により蛍光イメージングした結果、生細胞内の内在性 FR の動態を観測することに成功した。さらに、LDAI 化学により FR を環境応答性色素で修飾した結果、細胞膜上の内在性 FR がリガンド分子と結合する挙動を蛍光変化で直接読み出せる蛍光バイオセンサーの構築を達成し、それにより生細胞表層における FR と各種リガンド分子との結合定数および結合速度定数の定量的な算出を実現した。

氏　名	藤　島　祥　平

（論文審査の結果の要旨）

本論文は、生細胞内の様な生理環境下で標的タンパク質を人工小分子により選択的に標識する手法を考案し、標識したタンパク質の機能や細胞内局在を詳細に解析した結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 生体直交性の高いアスパラギン酸３連続配列ペプチドタグ（D3-tag）に対して強固に結合する、新規の二核ニッケル(II)錯体（Ni(II)-DpaTyr）を開発した。この相互作用ペアは認識部位の多量化および構造最適化により、抗原抗体反応に匹敵する非常に高い親和性を達成した。Ni(II)-DpaTyr の高い親和性はタンパク質上に融合標識した D3-tag に対しても保持されていることを蛍光滴定実験により確認し、さらに光増感剤を修飾した Ni(II)-DpaTyr 錯体を用いて、大腸菌破砕液中に含まれる D3-tag 融合βガラクトシダーゼの酵素活性を光照射により選択的に抑制できることを明らかにした。
2. ヒスチジン連続配列ペプチドタグ（His-tag）と選択的に相互作用する新規の亜鉛(II)錯体（Zn(II)-Ida）を開発した。Zn(II)-Ida は多価の配位結合によって His-tag と強く結合し、さらに Zn(II)-Ida 錯体を担持した蛍光プローブ分子は、His-tag の認識にこれまで用いられてきた Ni(II)-NTA 錯体を担持した蛍光プローブよりも５倍高い蛍光量子収率を有することを確認した。それにより、Zn(II)-Ida 型蛍光プローブは哺乳類細胞膜上に発現させた His-tag 融合 G-タンパク質共役型受容体を、従来よりも高感度に蛍光イメージングできることを明らかにした。
3. タンパク質表面への新規化学修飾法として、リガンド指向型アシルイミダゾール化学（LDAI 化学）を開発した。LDAI 化学は、タンパク質リガンドと標的タンパク質との相互作用を駆動力として、標的タンパク質の機能を損なうことなく、活性中心近傍を部位特異的に修飾可能であることを見出した。そして、様々なタンパク質に対しても効率的に適用できることを明らかにした。さらに、生細胞表層に発現する膜タンパク質を LDAI 化学で修飾することにより、細胞膜上でタンパク質がリガンド分子を認識する挙動を蛍光変化で直接読み出せる蛍光バイオセンサーの構築を達成し、それによるリガンド―タンパク質間の細胞膜上での結合定数および結合速度定数の導出にも成功した。

本論文は、上記の通り、標的タンパク質を人工小分子により選択的に標識する手法を開発し、その手法により細胞破砕液中のみならず細胞内のタンパク質の機能解析を達成しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成２４年２月２０日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。