

京 都 大 学	博士 (工学)	氏 名	内之宮 祥平
論 文 題 目	Covalent Labeling and Functional Analyses of Target Proteins in Living Cells Using the Interaction of His tag/Ni(II)-NTA Pair (His タグ/Ni(II)-NTA ペア間相互作用を利用した生細胞での標的タンパク質の共有結合ラベルとその機能解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>タンパク質は、生体内において分子認識や代謝、シグナル伝達に関与する重要な分子であり、その機能解析は生命現象の理解や創薬に重要である。タンパク質の機能解析を行うためには、蛍光色素やクロスリンカー等の人工機能性分子(プローブ)をラベル化することが有効であるが、細胞には多様な生体分子が存在するため、標的タンパク質のみを選択的にラベル化することは難しい。本論文では、生細胞での標的タンパク質選択的なラベル化と機能解析を行うための新しいケミカルツールを開発した。具体的には、オリゴヒスチジンタグ(His タグ)とニトリロ三酢酸の Ni(II)錯体(Ni(II)-NTA)間の配位結合に基づく相互作用を利用して、His タグ導入タンパク質にプローブを共有結合でラベル化する戦略である。本手法を用いて、生細胞での標的タンパク質の選択的ラベル化およびタンパク質間相互作用や蛍光イメージング等の機能解析を行った。本論文はこれらについてまとめたものであり、4章から構成される。</p> <p>第1章では、His タグ導入タンパク質に共有結合でプローブをラベル化する新規手法 His リアクティブタグを開発した。本手法では、Ni(II)-NTA にプローブおよび、反応部位であるベンゼンスルホン酸エステル(トシル基)を連結したラベル化剤を用いる。すなわち、Ni(II)-NTA が標的タンパク質上の His タグと相互作用することで、His タグのヒスチジン残基から Ni(II)-NTA のトシル基への求核攻撃が誘起され、His タグ導入タンパク質にプローブが共有結合的にラベル化されるという戦略である。本手法を用いて、精製系において、His タグ導入タンパク質に蛍光色素等の機能性分子をラベル化することに成功した。また、本反応は大腸菌ライセート中でも His タグ導入タンパク質選択的に進行した。さらに、既存のタンパク質共有結合ラベル化法 D4 リアクティブタグとの直交的ラベル化も、大腸菌ライセート内で実現可能であることを示した。</p> <p>第2章では、生細胞内で His タグ導入タンパク質を選択的にラベル化する手法を開発した。第1章で開発した His リアクティブタグは、ペア間の親和性と反応速度が低いため、生細胞で His タグ導入タンパク質をラベル化することは困難である。そこで、Ni(II)-NTA をダイマー化することで親和性を向上させた。さらに、反応速度を改善するため、His タグに求核性の高いシステイン残基を付加し、対応する Ni(II)-NTA の反応部位としてクロロアセチル基を用いた。以上の結果、Cys(His)₆ 配列に対して反応速度定数 $k_2 = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ でのラベル化を達成した。これは、現在最も速い生体直交反応である tetrazine ligation とほぼ同等のラベル化速度である。しかし、本系を細胞内でのラベル化に適応する際に、Ni(II)-NTA が細胞膜を透過しないことが問題となった。そこで、オリゴヒスチジンに細胞膜透過性のオリゴアルギニンを連結させたペプチドをキャリアーとして用いた。キャリアーの配列を検討した結果、(His)₄ と (Arg)₈ を連結させたキャリアーを用いた場合に、Ni(II)-NTA を迅速かつ効率良く生細胞内に導入することが可能となった。続いて、細胞内に発現させた His タグ導入タンパク質のラベル化をウエスタンブロッティングによって評価した結果、細胞膜の内側に発現させ</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	内之宮 祥平
------	--------	----	--------

たファルネシル化 EGFP や、細胞質に発現させた FKBP12-EYFP、FRB などの様々なタンパク質を選択的にラベル化可能であることが分かった。さらに、光クロスリンカーであるジアジリンを FRB にラベル化することによって、FKBP12 との rapamycin 依存的相互作用を、生細胞内で光架橋検出することに成功した。生細胞内で標的タンパク質を選択的にラベル化するためには、これまでタンパク質をタグとして導入する手法が主に用いられている。しかし、タンパク質タグのサイズが大きいため、光架橋によるタンパク質間相互作用の検出は困難であった。今回開発した His リアクティブタグのサイズはタンパク質タグの 1 / 10 以下であることから、光架橋によるタンパク質間相互作用の検出に適しており、今後生細胞内でタンパク質間相互作用を検出するツールとしての展開が期待される。

第 3 章では、細胞表層に発現させた His タグ導入タンパク質のラベル化を行った。第 2 章で開発した親和性と反応速度を向上させた His リアクティブタグを用いたところ、細胞表層に発現させた G タンパク質共役受容体であるブラジキニン受容体 2 型やムスカリン性アセチルコリン受容体を選択的にラベル化することに成功した。δ 2 グルタミン酸受容体のラベル化も可能であり、本手法が細胞表層の様々なタンパク質のラベル化に適応可能であることを示した。さらに、既存のラベル化法である D4 リアクティブタグとの直交的な共有結合ラベル化を生細胞表層で実現した。

第 4 章では、内在性のサイトカイン受容体をラベル化するための新規手法の開発を行った。本手法では、アシル転移反応触媒である DMAP(4-dimethylaminopyridine)を conjugate したサイトカイン(DMAP 化サイトカイン)を構築し、受容体をラベル化する。ここで、サイトカインは通常不安定であるため、簡便かつ迅速に DMAP 化サイトカインを構築するために His タグ/Ni(II)-NTA 間相互作用を利用した。具体的には、His タグ導入サイトカインに、DMAP を連結した Ni(II)-NTA を加えることで、非共有結合的に DMAP をサイトカインに conjugate した。この DMAP 化サイトカインを標的受容体が認識すると、近接効果に基づく受容体への、プローブを有するアシルドナーの転移反応が DMAP によって触媒され、標的タンパク質が選択的かつ共有結合的にラベル化される。本手法を用いて、HEK293T 細胞に強制発現させた EGFR や Neuropilin1 のラベル化を達成した。また、A431 細胞に発現している内在性の EGFR の選択的ラベル化も可能であった。最後に、A431 細胞の内在性 EGFR を蛍光標識することで、リガンド刺激に伴う EGFR の動態変化を蛍光イメージングした。その結果、TGFα で刺激した場合は EGFR がリサイクリングするが、EGF で刺激した場合はリサイクリングしなかった。このような EGFR の動態変化は、これまで固定化細胞を用いた免疫染色によって解析されてきたが、今回開発したラベル化法は生細胞における内在性 EGFR の動態観察を可能にした。以上の結果から、本手法は生細胞での内在性サイトカイン受容体の機能解析ツールとして有用であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、His タグ/Ni(II)-NTA 間相互作用を利用した生細胞における標的タンパク質選択的化学修飾法の開発と、それを利用したタンパク質の機能解析を行った成果についてまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1、His タグ導入タンパク質にプローブを共有結合ラベルする新規手法 His リアクティブタグの開発を行った。本手法を用いて大腸菌ライセート内での His タグ導入タンパク質の選択的なラベル化や、既存のラベル化法 D4 リアクティブタグとの直交的共有結合ラベル化にも成功した。

2、生細胞内でのラベル化を指向して、His リアクティブタグの親和性・反応速度を向上させた。細胞膜透過能を有さない Ni(II)-NTA を細胞内に導入するために、オリゴヒスチジンに膜透過性のオリゴアルギニンを連結させたキャリアを開発した。このキャリアを用いて Ni(II)-NTA を細胞内に導入した結果、生細胞内に発現させた His タグ導入タンパク質の選択的ラベル化に成功した。また、光クロスリンカーをラベル化することで、生細胞内でのタンパク質間相互作用を光架橋検出することが出来た。

3、His リアクティブタグを用いて、細胞表層に発現させた His タグ導入タンパク質の選択的ラベル化を行った。本手法を用いて、His タグを導入した GPCR やグルタミン酸受容体のラベル化が可能であることを示した。また、既存のラベル化法である D4 リアクティブタグとの直交的共有結合ラベル化を、生細胞表層で実現した。

4、サイトカイン受容体をラベル化するための新規手法を開発した。有機触媒である DMAP を、His タグ/Ni(II)-NTA 間相互作用を介してサイトカインに conjugate した。この DMAP 化サイトカインを用いた結果、生細胞表層に強制発現させた EGFR や Neuropilin1 のラベル化を行うことが出来た。さらに、生細胞に発現している内在性 EGFR に蛍光色素を選択的にラベル化することによって、様々な成長因子刺激に伴う EGFR の動態変化の違いを蛍光イメージングによって解析することに成功した。

本論文は上記の通り、生細胞での標的タンパク質の化学修飾およびそれを利用したタンパク質の機能解析を行っており、学術上、實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26年2月24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。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日： 2014 年 03 月 24 日以降