

| | | | |
|--|--|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (工学) | 氏名 | 安枝 裕貴 |
| 論文題目 | A method for chemical proteomics based on the selective localization of labeling molecules in living systems (生体における小分子局在に基づいたケミカルプロテオミクス手法) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>本論文は、有機小分子によるオルガネラ選択的なタンパク質修飾法を開発し、様々な培養細胞のオルガネラ選択的プロテオミクスや生体組織への応用、薬剤刺激に伴う動的なプロテオームの変化の解析についてまとめたものである。本論文はこれら研究成果についてまとめたものであり、序論および本論(三章)から構成される。</p> <p>(第一章)</p> <p>ミトコンドリアは ATP 産生や脂質代謝といった細胞機能の中核を担うオルガネラであり、ガンやパーキンソン病、アルツハイマー病などといった重篤な疾患とも関連が深いことが知られている。そのため、ミトコンドリアに存在するタンパク質のプロテオミクスは、これら疾病のバイオマーカー探索やメカニズムの解明に大きく役立つと考えられる。現在、ミトコンドリアにおけるタンパク質の解析は、ミトコンドリアを生化学的に単離して行われることが一般的である。しかし、この方法では他のオルガネラ成分の混入や、操作の煩雑さ、定量的な解析の難しさなどが大きな問題点として指摘されている。近年になり遺伝子工学的な手法も報告されているが、タンパク質の強制発現が必要であり、遺伝子発現系が確立されていない細胞系や組織への適応は不可能である。また強制発現により細胞の恒常性に影響を与えることも危惧される。そこで申請者は新しいアプローチとして、ミトコンドリアに存在するタンパク質を選択的に化学的にラベルし、プロテオミクスを行う技術の開発に着手した。最初にミトコンドリアをターゲットとした局在型反応性小分子 ORMs (Organelle-localizable Reactive Molecules)を設計・合成した。脂溶性カチオンであるローダミンを基本骨格とした様々な化学反応基を有する ORM ライブラリーを有機合成により得た。ローダミンを基本骨格とした ORM は、培養がん細胞(HeLa)においてミトコンドリアに濃縮されることを共焦点レーザー顕微鏡によって確認した。また生細胞上でラベル化反応を行い、ラベル化されたタンパク質を SDS-PAGE で分離し、ローダミンの蛍光により解析を行った。その結果、各 ORM でラベル化されたタンパク質の由来する蛍光バンドが観察できた。また蛍光バンドのパターンは ORM の反応基部分によって大きく異なることがわかった。これは、タンパク質表面のアミノ酸残基の反応性の違いを反映していると考えられる。</p> <p>次に、ラベル化されたタンパク質の同定を行った。具体的にはタンパク質を酵素消化によりペプチド断片化後、抗ローダミン抗体を用いた免疫沈降法によって標識化ペプチドを濃縮・精製し、LC-MS 解析を行った。その結果、5つの ORM で合計 375 個のタンパク質が同定でき、そのうち合計 259 個がのミトコンドリアへの局在が既知のタンパク質であった。この中にはミトコンドリアでの存在に決定的な証拠の無かったタンパク質なども含まれており、詳細に解析することで、さらに未知のミトコンドリアタンパク質の同定につながることを期待できる。また、この方法は、ラベル化ペプチドを LC-MS で直接検出するため、ORM が反応したアミノ酸残基を同定し、相互作用部位を明らかにすることも可能であった。また本手法は細胞の分画や遺伝子操作が不要な簡便なプロテオミクス手法である利点を生かし、HeLa 細胞と比較しさらに繊細な神経細胞の初代培養系や、脳スライス(組織)への展開を行った。ラット胎児から単離した</p> | | | |

| | | | |
|---|---------|----|-------|
| 京都大学 | 博士 (工学) | 氏名 | 安枝 裕貴 |
| <p>神経細胞の初代培養系においても ORM はミトコンドリアに集積し、ラベル化反応が進行することが分かった。また HeLa 細胞同様、神経細胞においても 212 個のタンパク質が同定でき、この内の 129 個 (61%) がミトコンドリアのタンパク質であった。続いて、マウスから摘出した脳から脳スライスを作製し、培養液に ORM を添加することでラベル化反応を行った。脳スライスにおいても SDS-PAGE においてラベル化タンパク質に由来する明確な蛍光バンドが確認できた。LC-MS によるタンパク質同定を行った結果、156 個のタンパク質が同定でき、この内 100 個 (64%) がミトコンドリアへの局在が既知のタンパク質であった。以上の結果より、本手法は培養がん細胞だけでなく神経細胞の初代培養系や、脳スライス(組織)においても適用可能な方法であることが示された。</p> <p>続いて細胞分化にともなう動的なプロテオーム変化の検出を行った。C2C12 細胞の分化の前後において ORM を添加し、ラベル化タンパク質のパターンを SDS-PAGE によって解析したところ、複数の ORM において分化にともなうラベル化タンパク質のパターンの変化が見られた。変化大きい、または変化のなかった蛍光バンドをピックアップし、ゲル内消化によって同定を行った。ヒットしたタンパク質を MS のスコアによって選択し、ウエスタンブロッティングによる発現量の確認を行ったところ、蛍光バンドと発現量の変化は良い一致を示した。</p> <p>より網羅的かつ定量的な解析を行うため、細胞の酸化ストレスによるアポトーシス過程におけるタンパク質発現の変化を本手法と定量プロテオミクスと組み合わせた検証を行った。SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) による定量解析の結果、255 個のタンパク質を定量解析することができた。またこの内 166 個 (65%) はミトコンドリアに局在するタンパク質であった。また酸化ストレスにおいて発現量が 2 倍以上増加した 21 個のタンパク質には ROS 応答やアポトーシスに関連したタンパク質が有意に濃縮されることがわかった。増加した 21 個の中の 5 つは酸化ストレスやアポトーシスの過程で既に増加が知られるタンパク質であった。また発現が減少した 8 つのタンパク質にはミトコンドリアの呼吸鎖の complex I に関連したタンパク質が 4 つ含まれることが分かった。complex I は主要な ROS の産生源であることが知られており、酸化ストレス応答に関連深いと考えられる。よって本手法は定量プロテオミクスを組み合わせることで、ミトコンドリアのタンパク質を網羅的かつ定量的に解析できることが分かった。</p> <p>(第二章)</p> <p>第一章にて開発した ORM によるプロテオミクス手法を、核タンパク質のプロテオミクスへと拡張を試みた。</p> <p>(第三章)</p> <p>本研究室で開発された 4-dimethylaminopyridine (DMAP) によるアシル転位触媒反応化学によるタンパク質修飾を用い、膜タンパク質のプロテオミクスへと展開した。DMAP に生体膜アンカリング部位となる様々な脂質を導入した脂質連結触媒 (BeD) を合成し、これを生細胞膜に担持させた。ここに修飾反応の基質となるアシルドナーを添加したところ、BeD によるアシルドナーのタンパク質への転位触媒反応が確認できた。反応したタンパク質を LC-MS で解析することにより、脂質部位で異なる様々な膜タンパク質の同定に成功した。</p> | | | |

