

京都大学	博士 (工学)	氏名	西川 雄貴
論文題目	Novel chemical labeling methods for analysis of protein function and cellular environment		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>蛋白質は生命活動を司る主要な生体高分子であり、その構造及び機能解析は、ライフサイエンスにおける中心課題となっている。現在では、蛋白質が本来機能する生細胞・組織そのまま解析、評価するための手法が盛んに開発されている。その中でも、生体内で内在的に発現する蛋白質を解析できる、有機化学的な蛋白質修飾法が注目されている。申請者は博士課程研究において、生細胞において特定の蛋白質を選択的に化学修飾する手法を開発し、蛋白質の局在及び機能のイメージング解析を行った。また、特定の細胞環境で活性化して蛋白質を修飾する手法を開発し、その環境に存在する蛋白質群の同定を行った。本論文はこれらの研究結果についてまとめたものであり、序論及び本論 (四章) から構成される。以下にその概要を示す。</p> <p>(第一章)</p> <p>我々の研究室では、遺伝子操作を行うことなく、細胞内在性の標的蛋白質を選択的に化学修飾するための手法として、リガンド指向性化学を開発してきた。本手法により、細胞内在性蛋白質を特異的にラベル化することに成功しているが、細胞内における反応速度や安定性などに課題を抱えており、細胞内蛋白質の蛍光イメージングへの展開は達成できていなかった。</p> <p>そこで申請者は、細胞内蛋白質の迅速なラベル化を目的として、新規リガンド指向性化学の開発を行った。まず、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) をモデル蛋白質とし、反応基としてフェニルエステル誘導体を基盤とした種々のラベル化剤群を設計・合成した。精製 eDHFR を用いた試験管内評価の結果、蛍光色素分子内の安息香酸をジブロモフェノールに直結させたラベル化剤が、優れた反応性と加水分解耐性を有することを見出した (「リガンド指向性 Dibromophenyl Benzoate 化学」)。次にこのラベル化剤を、生きた哺乳類細胞に発現させた eDHFR へと適用したところ、特異的かつ迅速・高効率 (3 時間で 80% 以上) なラベル化が確認でき、ライブイメージングも可能であった。</p> <p>(第二章)</p> <p>我々の研究室では、前述の LDBB 化学とは別にスルホニル化を利用した蛋白質修飾法として、「リガンド指向性 <i>N</i>-Sulfonyl Pyridone (LDSP) 化学」が最近開発された。精製蛋白質を用いた試験管内、及び内在性蛋白質を標的とした生細胞系での検討から、LDSP 化学は既存のリガンド指向性化学よりも迅速かつ特異的に標的蛋白質をラベル化可能であった。さらに標的蛋白質の適応範囲は広く、細胞表面及び細胞内の様々な蛋白質をラベル化可能であり、蛍光イメージングも可能であることが分かっている。</p> <p>そこで申請者は、LDSP 化学で蛍光ラベル化した内在性蛋白質を用いて、生細胞環境下で FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) センサーを構築する検討を行った。まず LDSP 化学により、細胞内蛋白質であるヒト炭酸脱水酵素 (CA) II に対して FRET ドナーとしてフルオレセインをラベル化した。次に、CAII の阻害剤 SA (sulfoneamide) に FRET アクセプターであるテトラメチルローダミン (TMR) を連結した化合物 (TMR-SA) を添加したところ、CAII 上において FRET が生じ、フルオレセイン蛍光の減少と TMR 蛍光の増加が確認された。更にそこに CAII の阻害剤を添加すると、TMR-SA が CAII から追い出されることによって FRET が解消し、フルオレセイン蛍光が回復した。この蛍光レシオ変化を詳細に解析することにより、阻害剤と CAII 間の相互作用の速度定数を定量化することに成功した。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	西川 雄貴
------	---------	----	-------

いくつかの阻害剤で速度定数を算出したところ、試験管内実験により求められた速度定数の報告値はほとんど変わらないのに対して、本系では 100 倍以上の差が確認された。これはおそらく、阻害剤の細胞膜透過性や夾雑環境下での動態といった、試験管内実験では加味することのできないファクターによるものだと考えられる。したがって本手法は、より生体に近い環境での薬物動態を解析するためのツールに繋がることが期待される。

### (第3章)

一酸化窒素 (NO) は心臓血管系、神経系、免疫系などの多様な生理機構において重要なシグナル伝達物質である。NO の生理機構は主に、蛋白質のニトロシル化、ニトロ化、活性酸化窒素種 (RNS) としての細胞ストレスであり、このことから、高濃度 NO 環境下において細胞内プロテオーム (発現量、翻訳後修飾パターン) が定常状態と大きく異なると予想される。これまでに、NO の局在に関しては NO 検出蛍光プローブ、NO の機能に関しては NO ドナーを用いた研究が盛んに行われている。しかしながら、NO に依存して変化するプロテオームを網羅的に解析するツールは未だに開発されていない。そこで今回申請者は、ごく最近開発した特定の環境に応答して活性化される蛋白質ラベル化剤を用いる「conditional プロテオミクス」のコンセプトを応用することにした。まず申請者は、NO に応答して活性化し、蛋白質との反応性が大きく向上する NO 応答性ラベル化剤の設計・合成を行った。このラベル化剤はアシル化された *o*-phenylenediamine 構造を有しており、これが NO と酸素存在下で acylbenzotriazole に変換されると、アシル基の求電子性が高まり蛋白質へのラベル化反応が進行すると期待した。実際に試験管内で細胞ライセートを用いたラベル化実験を行ったところ、狙い通り NO 存在化でのみ蛋白質へのラベル化が進行した。次に、炎症刺激により誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) が発現することが知られているマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いた検討を行ったところ、iNOS 発現誘導条件においてラベル化される蛋白質が増大した。このことから、今回開発したラベル化剤は生細胞内で産生される NO によって活性化し、蛋白質をラベル化できることが明らかになった。更に、ラベル化した蛋白質を免疫沈降法によって精製し、質量分析機器を用いた定量解析を行うことで、高濃度 NO 存在下における蛋白質群を同定することに成功した。

### (第4章)

細胞内には、リソソームに代表される内部が酸性 (pH 4.5~6.5) の各種オルガネラが存在し、細胞外からの物質の取り込み、細胞外への分泌、オートファジーによる細胞の恒常性維持などに関与し、多彩な機能を果たしている。細胞にとって重要な機構を担うリソソームの異常は、数多くの疾患に関与していると考えられている。特に、LSD (lysosomal storage disease) という、リソソームに関連した酵素が欠損することで分解されるべき物質が蓄積される状態に陥ると、様々な疾患に繋がることが知られている。したがって、リソソームのプロテオーム解析は、細胞機能や生命現象の解明において極めて大きな知見を与えると期待される。今回申請者は、リソソーム内の蛋白質を網羅的にラベル化、解析することを目的とし、酸性条件で活性化されるラベル化剤を開発した。 $\alpha$ -ジアゾカルボニル基を有するこのラベル化剤は、酸性条件において活性種であるカルベンの生成が促進され、蛋白質をラベル化した。更に、ラベル化剤にリソソーム局在能を付与することで、生細胞系でリソソーム内蛋白質をラベル化することに成功した。