

京都大学	博士 (工学)	氏名	藤沢 有磨
論文題目	Development of chemical labeling methods for organelle molecule analysis		

(論文内容の要旨)

細胞内分子の化学修飾は生命現象を解明する上で欠くことのできない強力なツールである。蛍光色素や光反応基といった合成小分子を細胞内に存在する標的分子に選択的に導入できれば、細胞内分子の機能を解析する上で有用であると考えられる。また、細胞内に存在する小区間であるオルガネラは、それぞれが独立して存在し、固有の機能を持つ。従って、オルガネラ分子を特異的に化学修飾する技術の開発が生命現象の解明に寄与するところは非常に大きい。本論文は、細胞内の特定オルガネラにおけるタンパク質、脂質の網羅的修飾法の開発、それを活用した修飾分子の解析についてまとめたものである。以下にその概要を示す。

第一章では細胞内オルガネラの一つである小胞体 (ER) の関連タンパク質を網羅的に化学修飾するための手法として ER 局在性反応試薬 (ERMs) の開発を行った。この分子は ER 局在性蛍光色素部位と求電子性反応基から構成されている。ERMs は ER 局在部位によって ER に特異的に局在し、濃縮効果によってタンパク質表面の求核性アミノ酸と求電子性反応基の反応速度上昇による共有結合形成が促進する。ERMs を開発するにあたって、種々の ERMs の ER 局在性を蛍光イメージングによって検証したところ、分子疎水性が局在性に大きく影響することを見出した。合成小分子の疎水性が高いほど ER への局在性が上昇することは経験的に知られていたが、これを体系化した例は報告がなかった。この結果は合成小分子の一般的な設計指針として極めて重要な知見となった。

第二章では、第一章で開発した ERMs を用いて ER タンパク質を修飾し、質量分析を用いて網羅的解析を行った。ERMs を添加した HeLa 細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE によって評価したところ、タンパク質と ERMs が共有結合を形成していることが明らかとなった。さらに、ERMs を添加した HeLa 細胞をメタノールで固定することで未反応の ERMs を細胞から除去し、蛍光イメージングによる観察を行ったところ、ERMs と共有結合を形成したタンパク質は ER に局在していることが明らかとなった。以上の結果より、ERMs によって ER タンパク質を特異的に修飾できることが明らかとなった。次に、ERMs によって修飾されたタンパク質を ERMs に対する抗体を用いて濃縮し、質量分析によって解析した。その結果、180 個の小胞体関連タンパク質を同定した。さらに、開発した ERM と以前当研究室で開発されたミトコンドリア局在性反応試薬と核局在性反応試薬を同時に用いることで、1 検体において異なるオルガネラプロテオームの同時解析を行った。HeLa 細胞に対して 3 つの修飾試薬を同時に添加したところ、試薬はそれぞれの対象オルガネラに局在することが明らかになった。修飾タンパク質を質量分析によって解析した結果、各試薬によって対象オルガネラタンパク質が 79% 以上の同低率で同定された。すなわち、本手法は 1 検体における複数オルガネラタンパク質の同時解析に応用可能であり、従来法では評価できなかった実験誤差の極めて少ない生命現象解析を可能にすると期待される。最後に ERM と安定同位体標識法を組み合わせる

京都大学	博士 (工学)	氏名	藤沢 有磨
------	---------	----	-------

ことで、ER タンパク質発現量変化の定量解析を行った。本手法を実証するために ER ストレスの 1 種である Unfolded Protein Response (UPR) を選択した。UPR は ER 内におけるタンパク質凝集をシグナルとして、様々な遺伝子発現が変化し、タンパク質凝集を解消する反応を指す。安定同位体標識した HeLa 細胞に UPR を誘導する糖鎖修飾阻害剤、ツニカマイシンを添加した。この細胞の ER タンパク質を ERM で修飾し、ERM に対する抗体で濃縮した。このタンパク質を UPR 誘導を行わないタンパク質と混合し、質量分析における同位体存在量比解析から発現量変化を測定した。その結果、UPR によって発現量が増加した ER タンパク質を複数同定した。その中には、UPR のマーカータンパク質が含まれていたことから、本手法が ER タンパク質の網羅的解析だけでなく、定量的な解析にも応用可能であることが明らかとなった。ERMs は ER タンパク質の網羅的な解析を行う新規技術であり、生細胞の環境に近い ER タンパク質解析ツールとしての展開が期待される。

第三章では ER に局在する脂質を特異的に修飾することができる、新規な化学生物学的手法の開発を行った。前章と同様の ER 局在性蛍光色素とジベンゾシクロオクチン連結することで ER 局在性クリック反応試薬 (ER-localizable Click Reagent: ER-OCR) を開発した。ER-OCR は前章と同様の原理で細胞内 ER に濃縮される。これを細胞脂質に対するアジ化コリンの代謝導入と組み合わせることで、ER 特異的な歪み促進型アジドアルキン付加環化反応 (SPAAC) による脂質修飾を行った。HeLa 細胞脂質にアジ化コリンを代謝導入し、ER-OCR を処置したところ、ER-OCR の蛍光が ER から観察された。この細胞から脂質を抽出し、TLC によって脂質への修飾反応を評価したところ、アジ化コリンを処置した細胞から ER-OCR 修飾脂質と思われる蛍光スポットが観察された。このスポットから脂質を精製し、質量分析によって解析すると、ER-OCR が修飾された phosphatidylcholine (ER-PC) が検出された。次に、アジ化コリンの有無で蛍光イメージング結果を比較した。アジ化コリンを添加していない HeLa 細胞は ER-OCR 添加による脂質ラベル終了時点から 15~30 分で ER-OCR の蛍光が認められなくなったが、アジ化コリンを添加した細胞では 9 時間以上の長時間培養後も細胞内から ER-OCR 蛍光が観察された。また、ER-OCR はタンパク質と共有結合を形成しなかったことから、本手法によって ER 脂質を特異的に修飾し、蛍光イメージングで解析可能であることが示された。ER-PC の細胞内特性を光褪色後蛍光回復法 (FRAP) によって評価した。その結果、ER-PC の拡散係数は 0.82 であり、細胞に代謝導入した脂質アナログや、小胞体膜タンパク質と近い値になった。一方で ER 内腔タンパク質に発現させた KDEL-RFP の拡散係数は 3.49 と ER-PC に比べて非常に大きかった。これは脂質膜上の分子が 2 次元拡散するのに対して、ER 内腔の分子は 3 次元拡散が可能であるためだと考えられた。以上の結果より、ER-PC の拡散は脂質膜上の分子と同等であり、ラベル化による影響をほとんど受けていないことが示唆された。最後に、ER-PC が ER から他のオルガネラへの輸送を蛍光イメージングを用いて観察した。その結果、ER-PC は 3 時間程度で Lysosome や Plasma Membrane に、1 時間程度でミトコンドリア外膜へ移行することを明らかにした。本手法はオルガネラ脂質を選択的に化学修飾可能な技術であり、脂質そのものを蛍光イメージング可能である。そのため、従来タンパク質を用いて間接的に解析されていた小胞体脂質解析に大きく寄与する技術であると期待される。