

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	寶本 俊輝
論文題目	Development of a novel method for time-resolved-diffusion detection of protein reactions and its application (時間分解拡散観測手法を利用したタンパク質反応検出法の開発とその適用)		
(論文内容の要旨)			
<p>生体機能の解明にはタンパク質の機能を理解することが重要である。タンパク質は外部刺激や分子間相互作用に伴いその構造を変化させ、機能が発現する。そのため、タンパク質反応を分子レベルで理解し、会合状態の変化や分子内部の立体構造変化を明らかにすることは重要な研究になる。本研究ではタンパク質の拡散係数に着目し、タンパク質反応における拡散係数の変化を時間分解で追跡するための手法開発を行っている。拡散係数は分子サイズの変化に敏感であり、会合状態の変化など構造変化を捉える際に役立つ。拡散を高速で測定し、反応の時間分解検出に適用できる手法として、過渡回折格子 (TG)法が利用されてきた。しかし、本手法は測定対象が光応答するものに限定され、多様なタンパク質反応研究への適用は困難であった。</p> <p>本研究ではTG法を拡張し、従来のTG法では反応検出が困難な系へと適用できる、新しい時間分解拡散観測手法の開発を行った。まず、光に依存しない様々なタンパク質反応を駆動するために、溶液の高速混合と急速停止によって反応検出を行うストップフロー (SF)法をTG法と組み合わせた測定系 (SF-TG法)の確立を行った。SF-TG法では二種の反応液の高速混合で反応を駆動し、送液停止時点を基準に遅延時間を設けてTG測定を行う。遅延時間を変えることで反応の様々な時間で対象の拡散係数を測定し、反応に伴う構造変化を拡散係数変化として検出できる。SF-TG法はサンプル消費量が大きいため、これを低減するためのSFシステムを開発した。本システムではサンプル消費量を1回の高速混合において3 μL程度に抑えることに成功した。</p> <p>測定対象の拡大にはSF-TG法の確立だけでなく、光応答しない分子ではTG測定において拡散信号が検出されない問題を克服しなければならない。多くのタンパク質が光応答性を示さないため、タンパク質を光応答分子でラベルし、本来光反応しない対象に光応答性を付加することでTG測定を可能にした。ここでは spiropyranの誘導体をラベル剤として使用した。 spiropyranは閉環状態と開環状態の二状態を紫外光/可視光励起で切り替えられるフォトクロミック分子である。 spiropyranでラベルしたタンパク質は TG測定において拡散信号を容易に検出でき、信号の解析で得られるタンパク質の拡散係数は他の拡散測定の結果と矛盾がないことを示し、様々なタンパク質において拡散係数を精度よく決定できるようになった。</p> <p>測定法開発の最終段階として、SF-TG法とタンパク質ラベリング法を組み合わせることで実際にタンパク質反応検出を行った。そこではα-Synuclein (αSyn)を対象とした。αSynは界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS)との相互作用により構造変化する。本研究ではspiropyranを付加したαSynと、SDS溶液を高速混合し、SF-TG法を用いて会合過程におけるαSynの拡散係数変化を追跡した。更に分子内部の構造変化を追跡する別の反応検出法も利用しながら、会合過程について、多数のSDSモノマーとの会合が先立って中間状態が生じ、中間状態とSDSミセルとの会合が起こる反応として帰属した。以上より新たに確立した手法を用いてタンパク質反応検出を行う段階に至り、今後SF-TG法を様々なタンパク質反応研究に利用できることが期待される。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質の機能を理解する上で、タンパク質の会合状態や分子内部の立体構造変化を捉え、タンパク質反応を分子論的な観点から解明することは重要である。タンパク質の構造変化を捉える手法はいくつか存在する中で、本論文は過渡回折格子(TG)法と呼ばれるレーザー分光法に着目している。TG法は対象分子の光反応を利用して分子拡散を高速で測定できる手法であり、分子の拡散係数を測定することで、タンパク質の会合状態の変化などを捉えることが可能である。しかしながら、TG法による拡散測定では光励起を必要とし、光で駆動される以外の反応検出に適用することが難しく、また、測定対象も光応答性分子に制限されるという問題も生じる。本論文では、溶液混合によって反応を駆動するストップフロー(SF)をTG法と併用した新しい測定系(SF-TG法)を立ち上げ、光に依存しない様々なタンパク質反応を駆動して反応検出を行う手法を確立した。更に、測定対象が限定される問題についてはタンパク質をspiroopyranと呼ばれる分子でラベルし、光応答性をタンパク質に付加することで、様々なタンパク質における拡散測定を可能にしている。

本論文において示されたSF-TG法の確立に際して、SFシステムの開発が行われている。これは、サンプル消費量を低減するためにマイクロ流路で溶液を急速混合するシステムとなっている。本システムは、溶液混合部や測定部の体積が10倍以上大きい市販のSF装置と比較した際に、サンプル消費量を50分の1程度まで低減できている。また、SF-TG法においては測定可能になるまでの消費時間であるデッドタイムを10分の1まで低減することに成功している。

TG測定を行う際に測定対象が限定される問題に対してはspiroopyranをラベルすることで問題を克服している。spiroopyranのラベリングはタンパク質の構造に大きな影響を及ぼさず、タンパク質の拡散係数を精度よく決定することを可能にしている。一方先行研究において、光応答分子であるstilbene誘導体をタンパク質に付加しTG測定を行った報告がある。このラベル剤と比較した場合spiroopyranをラベルしたタンパク質では100倍以上の信号強度での測定が可能になっている。過去に使用されたラベル剤に対して測定感度が向上し、より低濃度での測定が可能となった。

本論文では、spiroopyranでラベルしたタンパク質を対象にSF-TG法を適用し、タンパク質の構造変化を研究した結果について報告されている。そこでは天然変性タンパク質である α -Synucleinが、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムのミセルと会合して構造変化する過程を、拡散係数の変化として明らかにされている。

以上より、本論文における研究ではSF-TG法が開発され、タンパク質ラベル法と組み合わせることで、様々なタンパク質反応を駆動し、そこで生じた分子の構造変化を追跡することが可能となった。SF-TG法は、従来の吸収測定などと併用しながらタンパク質反応研究を進展させる有用なものになると判断される。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年1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た結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降