

京都大学	博士 (工学)	氏名	高岡 洋輔
論文題目	Development of New Methods for Chemical Labeling, Functionalization and Detection of Proteins by Ligand-tethered Probe (リガンド連結プローブを用いた蛋白質の化学修飾・機能化および検出法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>蛋白質は生体内で起こるほぼ全ての反応を司っており、これを自在に化学修飾・機能化できれば、合成小分子では達成できない高性能な分子の創製が期待できる。本論文はこの標的蛋白質に対する特異的な化学修飾法と機能化を、様々な物質が混在する細胞内で可能とする手法の開発、および蛋白質を ^{19}F NMR/MRI で検出する分子プローブの開発についてまとめたものであり、四章からなっている。</p> <p>第一章では、蛋白質表面への新規化学修飾法として、アフィニティーラベル化後修飾法 (Post-Affinity Labeling Modification, P-ALM) の開発をおこなった。標的として炭酸脱水酵素 (CAII) を選択し、この酵素の阻害剤認識によるアフィニティーラベル化と、その後に連続するシッフ塩基交換反応を利用して、有機小分子のワンポットでの定量的な修飾に成功した。そのラベル化サイトは CAII の活性中心近傍に存在する His 3, 4 のみであり、本手法が部位特異的な修飾法であることを示した。また、ラベル化した CAII は野生型 CAII とほぼ同等の酵素活性を示したことから、本手法が蛋白質に対して穏和な条件で適用できる事を明らかにした。さらに各種蛍光色素を修飾することにより、CAII が阻害剤を認識する挙動を蛍光変化で検出できる、阻害剤蛍光バイオセンサーの構築にも成功した。</p> <p>第二章では、アフィニティーラベル化にトシル基による求核置換反応を用いることによって、1ステップで蛋白質にプローブを導入可能な、リガンド指向型トシル化学 (Ligand-Directed Tosyl Chemistry, LDT 化学) の開発をおこなった。本ラベル化法では、細胞に内在する標的蛋白質のみを、活性を保持したままで高選択的に標識可能であった。具体的には、赤血球に内在する CAI へのラベル化と、マアナゴ表面組織に内在するレクチン (Congerin II) へのラベル化をおこない、いずれにおいても標的蛋白質に対する特異的な蛍光ラベル化を確認した。CAI の LDT 化学によるラベル化部位は、試験管中・細胞中のどちらにおいても、活性中心近傍に存在する His 67 であることが確認された。一方 Congerin II のラベル化部位は Tyr51 であり、LDT 化学が様々なアミノ酸に対して修飾できる一般性の高い方法であることを示唆する結果を得た。さらに赤血球内 CAI を標的とし、体内深部でも検出可能な ^{19}F NMR プローブを導入する事を試みた。その結果、^{19}F NMR でラベル化反応を試験管中・細胞中でリアルタイムに追跡可能であり、^{19}F プローブを導入した CAI は、^{19}F NMR を読み出しシグナルとした阻害剤バイオセンサーとして機能する事が明らかとなった。このバイオセンサーは赤血球内でそのまま構築する事ができ、細胞内で阻害剤の親和性と細胞膜透過性を同時に評価する事ができた。</p>			

氏名	高岡洋輔
----	------

第三章では、前章で検討した ^{19}F NMR プローブの CAI へのラベル化反応について、詳細な反応メカニズムの解析をおこなった。まず ^{19}F NMR ラベル化剤は水中で自己集合し、そのため ^{19}F NMR シグナルが完全に消失している事を発見した。この会合体形成は、LDT ラベル化剤が水中で加水分解するという副反応を効率的に抑制していた。この結果は、求電子試薬を蛋白質の化学修飾に用いる際にその分解や非特異反応を抑制する一つの戦略として、会合体形成が有効な方法である事を示唆しており、今後の蛋白質修飾における重要な知見になると考えられる。また前章で構築した ^{19}F NMR を基体とする阻害剤バイオセンサーの、阻害剤認識におけるケミカルシフト変化のメカニズムを解明するため、X 線結晶構造解析をおこなった。その結果、 ^{19}F NMR プローブが CAI の活性ポケットに埋め込まれた状態から、阻害剤の添加に伴ってバルクに追い出されていることが明らかとなり、この環境変化がケミカルシフト変化の主な要因である事を実証した。さらに赤血球中でのラベル化メカニズムを詳細に解析していく中で、認識に利用した反応後のリガンド部分が、細胞内ではアニオントランスポーターによって細胞外に除去されていることを突き止めた。反応後のリガンドの除去は、蛋白質のバイオセンサー化において必須の精製操作であると考えられるため、今回の知見から新たな戦略が構築されると期待できる。

第四章では、前章で発見した ^{19}F NMR ラベル化剤の自己集合性を利用して、細胞内在性蛋白質の存在および活性を、 ^{19}F NMR シグナルの Turn-on 型で MRI 検出可能なプローブの開発をおこなった。本プローブが形成するナノメートルサイズの自己集合体の特性や形状観察をおこない、 ^{19}F NMR シグナルのオフオン変化のメカニズムを解明した。本戦略は様々な蛋白質や血清が混在する中でも、標的蛋白質のみを特異的に検出可能であった。また本プローブは、蛋白質が特異的に認識するリガンドを分子内に組み込んだ構造であるため、リガンド分子の変更により様々な蛋白質にも適用可能であることを、いくつかのプローブを設計・合成する事で明確に示した。さらに赤血球に内在する CA を標的とした場合、細胞ベースでの CA 阻害剤アッセイ系の構築にも成功した。本戦略は次世代型 MRI プローブとして注目を集める ^{19}F MRI プローブにおいて、一般性に優れた極めて新規性の高いスイッチング原理であった。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞内で適用可能な蛋白質の部位特異的な化学修飾法と、それによるバイオセンサーを構築する手法の開発、および蛋白質を検出可能な ^{19}F MRI プローブの開発に関する研究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. 蛋白質への新規化学修飾法として、アフィニティーラベル化後修飾法 (P-ALM) の開発をおこなった。本手法は標的酵素の阻害剤認識によるアフィニティーラベル化と、その後に連続するシッフ塩基交換反応を利用したもので、部位特異的かつ酵素の活性を保持したままでの、有機小分子のワンポットでの修飾に成功した。さらに、各種蛍光色素を導入することにより、酵素が阻害剤を認識する挙動を蛍光変化で検出する、阻害剤蛍光バイオセンサーの構築にも成功した。
2. アフィニティーラベル化にトシル基による求核置換反応を利用して、1ステップで蛋白質にプローブを修飾可能な、リガンド指向型トシル化学 (LDT 化学) の開発をおこなった。本ラベル化法では、細胞に内在する標的蛋白質のみを、活性を保持したままで高選択的に標識できた。さらに赤血球に内在する炭酸脱水酵素 (CA) を標的とし、 ^{19}F NMR を読み出しシグナルとしたバイオセンサーを赤血球内でそのまま構築することに成功した。このシグナル変化のメカニズムを蛋白質の X 線結晶構造解析から明らかとするのと同時に、試験管中・赤血球中でのラベル化メカニズムを詳細に解明し、今後の蛋白質化学修飾における有用な知見を得た。
3. LDT 化学の詳細な解析の中で発見された ^{19}F NMR ラベル化剤の自己集合性を利用して、細胞内在性蛋白質を Turn-on 型で MRI 検出可能な、新規プローブの開発をおこなった。本プローブが形成するナノサイズの自己集合体の特性や形状観察をおこなうとともに、標的蛋白質に対する一般性を示した。さらに赤血球内 CA を標的とし、CA 阻害剤アッセイ系の構築にも成功した。

本論文は上記の通り、細胞内在性蛋白質の部位特異的な化学修飾、機能化および検出をおこなう新規プローブの開発を行っており、学術上、実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 22 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。