

京都大学	博士 (工学)	氏名	王 杭祥
論文題目	Development of Novel Chemical Labeling Methods for Functionalizing Natural Proteins (天然蛋白質の機能化のための新規化学修飾法の開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>蛋白質は生命活動を営む上で極めて重要な分子であり、その機能の解明或いは自由に操る技術の開発が求められている。有機化学的手法による天然蛋白質の化学修飾・機能化によって、新たな高性能蛋白質の創製が期待できる。本論文は、天然蛋白質に対する特異的な化学修飾法とそれを用いた機能化、さらに内在性細胞膜蛋白質のラベル化を可能とする新しい方法論の開発についてまとめたものであり、三章からなっている。</p> <p>第一章では、糖修飾をセンシングする新規蛍光レシオ型バイオセンサーの構築を行った。標的としてコンカナバリン A(Con A)を選択し、光アフィニティーラベル化後修飾法(Post-PhotoAffinity Labeling Modification, P-PALM)を利用することで、部位特異的に pH 応答性色素 SNARF の導入を行った。この SNARF 修飾 Con A を用い蛍光滴定を行った結果、糖の 1 位のアノマー構造を識別し、レシオ変化により糖修飾を精密に読み出す蛍光バイオセンサーになることを確認した。</p> <p>また、天然蛋白質の表面に存在する求核性残基をラベル化する修飾法である、リガンド指向型トシル(Ligand-Directed Tosyl, LDT)化学を利用して、Src Homology 2 (SH2) domain を標的蛋白質としたラベル化反応をおこなった。そのラベル化部位は SH2 domain のリガンド結合ポケットの近傍に存在する His407 のみであり、本手法が部位特異的な手法であることを実証した。本ラベル化手法を用いて、SH2 domain に光クロスリンカーであるベンゾフェノン(Bp)を導入し、光クロスリンクプローブの構築に成功した。このプローブにより、リン酸化チロシンを含むペプチドを選択的にクロスリンクできることを示した。</p> <p>第二章では、前述の LDT 化学をベースにして、自己消光型 LDT (Q-LDT)法を新しく開発し、SH2 domain の one-step でのバイオセンサー化に成功した。具体的には、蛍光発光団のクマリンをトシル反応基を介して蛋白質プローブとして導入し、蛍光消光団となる Dabcyl をリガンド側に連結させることで、Q-LDT ラベル化剤を設計し合成した。本系のモデル蛋白質として SH2 domain を用い、Q-LDT ラベル化剤と反応させると約 30%のラベル化率を達成できた。ラベル化反応後、過剰のラベル化剤をゲル濾過精製で除去し、吸収スペクトルからクマリンと dabcyl の存在を確認した。この際に、リガンド部分(消光剤)が非共有結合的に SH2 domain に残るため、蛍光が抑制され、SH2 domain が</p>			

氏名	王 杭祥
----	------

リン酸化ペプチド配列を認識すると、蛍光の回復が見られた。この蛍光 turn-on バイオセンサーを用いて種々のペプチドの親和性を蛍光変化で検出できることを実証した。さらに大腸菌ライセート中での SH2 domain を標的とし、夾雑系での蛋白質のラベル化及び蛍光 turn-on 型センサーの構築に成功した。

第三章では、アフィニティーリガンドに多価の有機触媒 dimethylaminopyridine (DMAP) を連結させて、蛋白質の特異的なラベル化手法(Affinity-Guided DMAP chemistry, AGD 化学)の開発をおこなった。具体的には、標的となる蛋白質のリガンドにそれぞれ mono-, di-, tri-DMAP を導入し、ラベル化反応の触媒として用いた。また、アシル基転移反応のドナーとしてチオエステル化合物を用いた。モデル蛋白質として SH2 domain と FKBP12 を選択し、ラベル化反応を検証した。その結果、mono-DMAP 触媒に比べて、di-DMAP 及び tri-DMAP を用いた場合はその反応速度および収率が大幅に向上することを見出した。SH2 domain の場合、反応初速度はそれぞれ 6.7 倍及び 17.2 倍の加速が見られ、FKBP12 のラベル化においても 4.7 倍と 11.5 倍の加速が確認された。この DMAP 触媒によるラベル化部位は、SH2 domain では Lys379、FKBP12 では Lys44 であることが確認され、本手法が部位特異的な修飾法であることを明らかにした。さらに、DMAP の多価効果による蛋白質の加速効果のメカニズムを検証すると、DMAP がアシルドナーを活性化させる役割のみならず、塩基としてラベル化残基である Lys の脱プロトンまた他の DMAP の活性化という役割をしていることが明らかとなった。

上述の AGD 化学を利用し、細胞膜受容体のラベル化をおこなった。標的として G protein-coupled receptor (GPCR) の 1 種である bradykinin B₂ receptor (B₂R) を生きた細胞膜に局在させたまま、ラベル化を試みた。その結果、反応が特異的に B₂R に進行することを共焦点蛍光顕微鏡観察およびウェスタンブロッティングにより示した。また、mono-DMAP 触媒を用いた場合、反応が進行しないことを確認し、本系での膜受容体のラベル化には AGD 化学の多価効果が必須であることを示した。さらに蛍光ラベル化させた B₂R を活用して、細胞ベースでのアンタゴニストアッセイ系の構築にも成功した。本ラベル化技術は、創薬ターゲットである GPCR の蛍光標識やアゴニスト/アンタゴニストのスクリーニングに貢献できると期待される。また、この多価 DMAP 触媒の有用性を示すために、ヒト口腔がん細胞である KB 細胞の膜に内在的に発現する葉酸受容体(folate receptor, FR)のラベル化を行い、選択的に FR ラベル化が進行していることを確認した。本戦略は内在性蛋白質をラベル化できる新たな手法として応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、天然蛋白質に対する特異的な化学修飾法とそれによる機能化、さらに内在性細胞膜蛋白質のラベル化を可能とする手法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. 光アフィニティーラベル化後修飾法 (P-PALM) を用いて、コンカナバリン A (Con A)への pH 応答性色素 SNARF の導入および糖の修飾を精密に読み出す蛍光レシオ型バイオセンサーの構築に成功した。また、天然蛋白質の表面に存在する、求核性残基をラベル化する手法であるリガンド指向型トシル化学(LDT 化学)を用いて、光クロスリンカーであるベンゾフェノン を蛋白質 SH2 domain に導入し、光クロスリンクプローブの構築に成功した。
2. 前述の LDT 化学をベースにして、自己消光型 LDT(Q-LDT)法を新しく開発し、SH2 domain の 1 ステップでのバイオセンサー化に成功した。まず、Q-LDT ラベル化剤を用いて、SH2 domain のラベル化を施した Q-LDT 法は、ラベル化後、リガンド部分(消光剤)が非共有結合的に蛋白質に残るため、蛍光が抑制され、これがリン酸化ペプチドを認識すると蛍光が回復するという turn-on バイオセンサー構築の新戦略である。さらに大腸菌ライセート中での SH2 domain を標的とし、夾雑系での蛋白質のラベル化及び蛍光センサーの構築にも成功した。
3. アフィニティーリガンドに多価の有機触媒 DMAP を連結させて、蛋白質の特異的なラベル化手法(AGD 化学)の開発に成功するとともに、触媒反応の多価効果の概念を創出した。この多価効果を利用して、精製蛋白質において、ラベル化反応の速度及び収率の顕著な向上を達成した。また、ラベル化部位の精密解析を行い、反応の特異性が保持されることを明らかにした。本手法を細胞膜受容体蛋白質の修飾に展開し、強制発現系 bradykinin B₂ receptor (B₂R)および内在性葉酸受容体(FR)のラベル化に成功した。さらに蛍光ラベル化 B₂R を用いて、生細胞ベースでのアンタゴニストアッセイ系の構築にも成功した。

本論文は上記の通り、天然及び細胞内在性蛋白質の部位特異的な化学修飾を行う新規化学法の開発を行っており、学術上、實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12月20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。