

京都大学	博士 (医学)	氏名	藤 浩 平
論文題目	Chemoproteomic Identification of Blue-Light-Damaged Proteins (青色光照射で損傷したタンパク質のケモプロテオミクス解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>青色光は、オプトジェネティクスなどの生物学実験に広く使用されている。しかし、生細胞への青色光照射は、一般的に細胞毒性があり、過剰な照射は細胞死を引き起こす。これは内因性光増感剤が青色光を吸収して一重項酸素(<math>^1\text{O}_2</math>)を発生させ、核酸、脂質、タンパク質が酸化されることが原因である。これら生体分子の一重項酸素による酸化機構はこれまで精力的に研究されており、酸化される核酸や脂質は同定されている。一方で、酸化されるタンパク質の同定は未開拓であった。その理由は、酸化されたタンパク質のみを選択的に解析するための方法論が確立されていなかったためである。そこで本研究では、その方法論を確立し、酸化されるタンパク質の網羅的同定を行った。</p> <p>その手段として、ケモプロテオミクス手法を採用した。すなわち、青色光照射で酸化したタンパク質に選択的に反応する化学プローブを開発し、反応したタンパク質を LC-MS/MS で網羅的に同定した。<math>^1\text{O}_2</math> 酸化タンパク質に選択的に共有結合できる化学プローブを探索したところ、プロパルギルアミン(Probe 1)が最も効率よいことが判明した。そこで、Probe 1 と反応した酸化タンパク質の LC-MS/MS 及び GO 解析を行った。その結果、HeLa 細胞、メラノーマ細胞(B16F10)、角膜内皮細胞(iHCEC)において、細胞表面タンパク質が、ミトコンドリアタンパク質を含む他の影響を受けやすいタンパク質群よりも酸化されやすいことが判明した。特に、細胞表面受容体のインテグリンファミリー (ITG) は、ヒト角膜内皮細胞を含む試験した哺乳類細胞で高い順位を示した。</p> <p>インテグリンはインテグリン <math>\alpha</math> とインテグリン <math>\beta</math> で構成されるヘテロダイマータンパク質である。基質である細胞外マトリックス(ECM)が結合すると、活性化して細胞接着機能を獲得する。本研究では、酸化されたインテグリンファミリーの中でも、インテグリン <math>\beta 1</math> (ITGB1) についてさらに解析した。青色光照射による ITGB1 の活性変化を HeLa 細胞の免疫染色にて確認した。その結果、約 70% の ITGB1 が不活化していることが観察された。ITGB1 の下流シグナルである FAK の活性化も抑制されていた。さらに、細胞の接着機能を評価したところ、青色光を照射した約 90% の HeLa 細胞が培養皿に接着できないことが確認された。以上の結果から、インテグリンの光損傷が青色光による細胞機能障害に寄与していることが示唆された。また、本研究で発見した Probe 1 を様々な細胞や組織に応用することで、光感受性タンパク質の包括的な解析が可能になると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

青色光には細胞毒性があると一般に知られている。その原因は、青色光により核酸、脂質、タンパク質が酸化されて損傷されることによる。しかし、光による酸化タンパク質がプロテオームレベルで解析されたことはなかった。本研究では、青色光によって酸化されるタンパク質をケモプロテオミクス手法を用いて同定している。酸化したタンパク質に選択的に共有結合する化学プローブを探索したところ、プロパルギルアミン (Probe 1) が最も効率よいことが判明した。本プローブを用いて、青色光照射により酸化されたタンパク質を角膜内皮細胞を含んださまざまな培養細胞から精製し、質量分析により同定した。GO 解析の結果、細胞表面のタンパク質、特にインテグリンファミリーがおもに酸化されていることがわかった。

インテグリンは細胞外マトリックス (ECM) と結合することで活性化し、細胞接着機能を獲得する。本研究では、その代表として ITGB1 についてさらに解析し、青色光によって ITGB1 が不活化し、下流シグナルの FAK の活性化も抑制されることを示した。これらの結果は、インテグリンの光損傷が青色光による細胞機能障害に寄与していることを示唆する。また、本研究で利用した Probe 1 をさまざまな細胞や組織に応用することで、光感受性タンパク質の網羅的な解析が可能になると考えられる。

以上の研究は、青色光照射で損傷するタンパク質の同定に貢献し、光感受性タンパク質のプロテオミクス解析に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 ( 医学 ) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2023 年 8 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降