

京都大学	博士（工学）	氏名	高遠 美貴子
論文題目	Development of an optochemical method for spatially resolved proteome profiling <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> （光駆動近接ラベル化法の開発）		
In biological systems, proteins are organized, sometimes sequestered, into specific compartments to facilitate and economize the chemical reactions that sustain life. Often, the protein residents of these compartments are not only physically proximal to each other but also functionally interacting and intertwined in an elaborate network of protein-protein interactions (PPIs). Over the past decade, proximity labeling has emerged as a valuable tool for hypothesis-free protein interactome analyses in live cells and organisms. In proximity labeling, engineered enzymes (biotin ligases and peroxidases) are typically fused to a protein of interest to generate a short-lived reactive species that can promiscuously label proteins in the vicinity of the enzyme. Although this method is undoubtedly powerful, the fusion of an exogenous enzyme risks perturbing the native state of the protein of interest and may disrupt interactions that would otherwise occur. Moreover, existing proximity labeling methods suffer from a low temporal resolution when implemented in live animals. This thesis describes the development of an entirely chemical, nongenetic method for proximity labeling in live cells and organisms that aims to address these limitations. Named PhoxID (photooxidation-driven proximity labeling for protein identification), this method utilizes a small-molecule organic photosensitizer to locally generate ¹O₂, which can oxidize proteins within tens of nanometers from the photosensitizer upon green light irradiation. The oxidized proteins are then tagged by a nucleophilic reagent bearing an enrichable handle for identification by mass spectrometry. Chapter 1 describes the proof-of-concept of the PhoxID method <i>in vitro</i>. A DNA-binding photosensitizer and a cell-permeable labeling reagent were developed to label the nuclear proteome in live cell culture, and labeling was confirmed to occur in a light- and ¹O₂-dependent fashion. In Chapter 2, PhoxID was combined with ligand-directed chemistry to profile the interactomes of various neurotransmitter receptors <i>in vivo</i>. Specifically, the extracellular interactomes of the endogenous AMPA-type glutamate receptor (AMPA), the GABA_A receptor, and the δ2 glutamate receptor were successfully characterized in the live, genetically intact mouse brain with just minutes of in-brain photoirradiation. Furthermore, PhoxID's high temporal resolution was leveraged to capture 10-minute "snapshots" of the AMPAR neighborhood in the neonatal cerebellum, leading to the identification of IGSF3 and NECTIN3 as developmentally regulated AMPAR-proximal proteins. Chapter 3 describes how an extracellularly bound photosensitizer can catalyze proximity labeling on the cytoplasmic side of a transmembrane protein. This strategy, dubbed "transmembrane PhoxID", could enable the mapping of elaborate multiprotein assemblies below the plasma membrane using traditionally cell-impermeable targeting modalities for the photosensitizer. As a proof-concept, intracellular and extracellular protein constituents of parallel fiber-Purkinje cell synapses were identified simultaneously using a photosensitizer conjugated to a nanobody for the δ2 glutamate receptor on isolated mouse brain tissues.			

本論文は、培養細胞および生きたマウス個体内において、遺伝子操作を行うことなくタンパク質の光近傍ラベリングを実施するための化学的方法論の開発と、これを応用したプロテオミクス解析についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 光増感剤と求核剤を有するビオチン修飾試薬を用いた新規光駆動近傍ラベリング法「PhoxID」を開発した。この手法では、光照射によって一重項酸素が光増感剤近傍で局所的に生じ、半径数十 nm 以内のタンパク質を酸化する。この酸化タンパク質を求核性修飾試薬によりビオチン標識し、精製後、LC-MS/MS 解析することで、光増感剤近傍に存在するタンパク質を同定可能である。申請者は、DNA に結合するように設計した光増感剤と *o*-phenylenediamine 型ビオチン標識剤を用いて本手法をヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞に適用し、本手法が DNA 周辺タンパク質の同定に有用であることを実証した。
2. 申請者は上述の PhoxID 法を生きたマウス脳内に展開し、3 種の神経伝達物質受容体(AMPA, GABA_AR, GRID2)の周辺プロテオーム解析を行なった。詳細な反応条件検討の結果、10 分以下の光照射で十分な受容体近傍プロテオームの検出を可能にする試薬およびプロトコルを確立し、受容体ごとに近傍プロテオームが異なることを明らかにした。さらに、申請者は PhoxID を用いて生後発達期の小脳 AMPAR インタラクトーム変化を解析し、NECTIN3 と IGSF という二つのタンパク質が幼若期特異的に AMPAR 周辺に発現することを見出した。
3. 生体膜を超えた近傍ラベリングを可能にする新手法として transmembrane PhoxID 法を開発した。膜タンパク質を標的とした既存の近傍ラベリングでは、膜の内側/外側のどちらか一方のタンパク質しか標識できないのに対して、本手法で修飾剤として用いる一重項酸素とプロパルギルアミンはいずれも膜透過性が高いため、膜内外のインタラクトームを同時に検出可能である。申請者は本手法の原理を培養細胞を用いて実証し、さらに脳スライスを用いた GRID2 近傍ラベリングに成功した。

本論文は上記の通り、光を反応駆動力とするタンパク質近傍ラベリング技術の開発に取り組んだものであり、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、令和 6 年 6 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て、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第 1 4 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。