

京都大学	博士（ 工学 ）	氏名	程 蓉
論文題目	Development of cuprous ion-responsive protein labeling reagents applicable <i>in vitro</i> and in live cells		
<p>This thesis described the development of an efficient Cu⁺-responsive protein labeling reagent, which responds to Cu⁺ by generating reactive electrophiles that react with and tag the proximal proteins, thus enabling the immobilization of Cu⁺ signals <i>in situ</i> and the identification of proteins located in Cu⁺-rich sites within cells.</p> <p>Chapter 1</p> <p>This chapter describes a copper ion-responsive protein labeling method and explores four distinct chemical tools to develop an effective Cu⁺-responsive protein labeling reagent for use in biology, particularly in living cells. Initially, four distinct copper ion-responsive chemical tools utilizing various chemical reactions have been designed and synthesized. Then tests <i>in vitro</i> and in live cells have been conducted to evaluate and compare the copper-responsiveness properties of these reagents. The analytical results revealed that all four types of reagents demonstrated copper ion-responsive protein labeling capabilities. Notably, the TPA-cage-masked quinone methide-based reagent (QmCuR) exhibited superior performance due to its high selectivity for Cu⁺ and its effectiveness in detecting elevated Cu⁺ levels within various cell models.</p> <p>Chapter 2</p> <p>This chapter continues to optimize the structural design and characterize the Cu⁺ -responsiveness properties of Cu⁺-responsive protein labeling reagent, and applies the optimal one to live cells. Initially, this chapter optimized the chemical structures of QmCuR developed in Chapter 1 to address its limited response to intracellular Cu⁺. To achieve it, various copper ion-ligand-appended quinone methide-based reagents have been designed and synthesized to optimize chemical structures. After obtaining the reagents, <i>in vitro</i> and in-live cell assessments and comparisons of the Cu⁺-responsive protein labeling capabilities of these reagents were performed to identify the most effective reagent and elucidate the Cu⁺-responsive reaction mechanisms of the reagent. These results demonstrate the remarkable selectivity of the optimal reagent for Cu⁺ over other bio-metal ions and ROS, as well as its superior Cu⁺-responsive efficacy both <i>in vitro</i> and in live cells compared to the QmCuR developed in Chapter 1.</p>			

Chapter 3

This chapter continues to explore the additional applications of the optimal Cu⁺-responsive protein labeling reagent (CuR) in different cell models to assess its reliability and investigate the intracellular regulation of labile Cu⁺ accumulation. Initially, the ATP7A knockout (KO) cell model was prepared, and the optimal CuR tool was utilized in the cells to assess its robustness in these cell models. Proteomics studies were also performed, thus enabling the identification and comparison of the labeled proteins in Cu(gtsm)-supplemented ATP7A WT and ATP7A KO cells to explore copper regulation changes. These results demonstrated the applicability of the CuR tool in different cell models, showed that the CuR tool exhibited advantages over the ICP-Mass method, and demonstrated specificity for Cu-concentrated cells. Additionally, the proteomics study suggested in situ interactions of cuproptosis proteins with Cu⁺ and highlighted the potential roles of the MXXXM motif in responding to toxic intracellular Cu⁺ levels, providing valuable insights into Cu⁺ regulation, trafficking, and export within living cells.

本論文は、必須微量元素の一つである銅に選択的に応答して活性化する新規タンパク質標識試薬の開発と、これを用いて生細胞内における一価銅イオン (Cu^+) の動態解析を行った成果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. Cu^+ に対して選択的に応答し活性化する反応基の探索を行った。特に4つの異なる構造を有する化合物（ジアゾ化合物、カテコール、ケージドカテコール、キノンメチド前駆体）について検討した。その結果、特にキノンメチド前駆体 (QmCuR) が Cu^+ に対する選択性が高く、試験管内および生細胞内で Cu^+ 濃度の上昇を検出するのに有効であることを見出した。

2. 次に、上述の QmCuR の化学構造を最適化した。具体的には、様々な Cu^+ キレーターを連結したキノンメチド前駆体を合成し、 Cu^+ による活性化能とタンパク質修飾能を評価した。さらにこれらの実験データから、このプローブがキノンを経由してタンパク質と反応すること、主な反応部位はシステイン、ヒスチジン、チロシンであることを示した。加えて、他の生体金属イオンや活性酸素に対する応答性を評価し、最適化した QmCuR が高い Cu^+ 選択性とタンパク質修飾能を有することを明らかにした。

3. 遺伝子改変や化学刺激によって銅代謝に摂動を与えたモデル細胞を用いて、 QmCuR の細胞内 Cu^+ 解析ツールとしての有効性を検証した。特に、 QmCuR が ATP7A 欠損細胞における Cu^+ の異常蓄積を検出可能であることを、定量的な共焦点蛍光顕微鏡解析によって実証した。さらに、 QmCuR と反応したタンパク質の質量分析によるプロテオーム解析の結果から、 ATP7A の欠損が Cu^+ の細胞内動態にどのように影響するかを明らかにした。加えて、近年報告された新しい細胞死である Cuproptosis 過程において、銅がミトコンドリア内に蓄積する可能性を初めて実験的に示した。

本論文は上記の通り、 Cu^+ に選択的に応答して活性化する新規タンパク質標識試薬の開発とその生細胞への応用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8月2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。