

京都大学	博士（工学）	氏名	野中 洋
論文題目	Development of Molecular Tools for Functional Analyses of Biomolecule Using Anion Recognition by Metal-Dpa Complexes		
（論文内容の要旨） 生体内には多種多様な分子が存在しており、生体機能を支えるための重要な役割を担っている。本論文は、特にいくつかの生体分子の重要性に着目し、その機能解析を行うための新規な分子ツールの設計、合成及び機能評価を行った結果をまとめたものであり、4章からなっている。 第一章では、ATP などの生体内リン酸アニオンを選択的に蛍光レシオメトリーにより検出可能な蛍光プローブ分子の開発をおこなった。リン酸認識部位としての Dpa/Zn 錯体構造と蛍光部位としてのキサントンを組み合わせた蛍光プローブ分子を用いることで、レシオメトリーによるリン酸誘導体のセンシングに成功した。レシオメトリーとは、シーソー型の変化を示す蛍光スペクトルにおいて、異なる2波長の蛍光強度の比を用いる検出手法である。蛍光の単調増減によるセンシングではプローブの局在などの要因により定量的な評価が難しい状況下でも、レシオメトリーを用いることで高精度かつ定量的な蛍光センシングが可能になる。結晶構造解析・分光学的な解析により、開発したセンサー分子の蛍光変化メカニズムは、リン酸種の認識に伴いセンサー分子のキサントン部位の電子状態が摂動をうけ、蛍光波長が変化することに起因することを明らかにした。 第二章では、タンパク質に遺伝子レベルで導入されたアニオン性のアスパラギン酸ペプチドタグ配列(D4)と、その配列と選択的に相互作用するプローブ分子(DpaTyr/2Zn)を用いた新規共有結合形成型のタンパク質標識システム（リアクティブタグシステム）の開発をおこなった。本標識法では分子認識による選択性と化学反応の選択性を相乗的に組み込むことで、高い選択性と安定な共有結合による標識を可能にした。標的とするタンパク質をラベル化するにあたり、DpaTyr/2Zn 誘導体の D4 タグ配列認識にともなう特異的共有結合反応を利用した。DpaTyr/2Zn に導入した反応部位（α-クロロアセチル）に対して、D4 タグ配列近傍に反応性アミノ酸（Cys）を配置することで反応速度の向上を図った。モデルペプチドにおいてD4 タグとCys 間の距離の最適化を行った結果、Ala を6個スペーサーとしてもつ CA6D4 タグが最も反応が速く、認識を伴わない反応との比較において初速度にして1500倍を越える反応性を獲得できた。最適化されたタグを導入したモデルタンパク質(EGFP-CA6D4)に対して本手法を適用したところ、タグ上の反応点に対して様々な機能性分子を特異的に修飾可能である			

ことが明らかになった。また、様々なフリーCys 含有タンパク質の混在下や大腸菌ライセート共存下においても極めて選択的に標的タンパク質に対して蛍光修飾可能であることが SDS-PAGE 解析などにより明らかとなった。

第三章では、前章で開発した D4 リアクティブタグシステムの特異的な修飾能を生かし、生細胞系での G タンパク質共役型受容体(GPCR)の標識と機能解析をおこなった。細胞膜結合性受容体の細胞外領域にリアクティブタグ配列を導入し、HEK293 細胞に発現させた。この細胞を蛍光プローブで染色したところ、受容体を発現している細胞膜上に標識由来の蛍光が選択的に観測された。この蛍光は細胞膜上の受容体局在と一致したことから、タグ導入受容体に対する選択的な標識であることが示された。共有結合による標識であることはブロッティングなどのラベル化後解析により明確に示された。また本ラベル化法による、GPCR のインターナリゼーション（脱感作現象）の蛍光イメージング、およびインターナリゼーションに由来するエンドソーム内のミクロ環境変化を検出することにも成功した。

第四章では、分子生物学でタンパク質の検出や精製に用いられる FLAG タグへの共有結合型標識手法の開発をおこなった。標的とする FLAG タグ融合タンパク質をラベル化するにあたり、二核金属錯体(DpaTyr/2Ni)誘導体による FLAG タグ配列 (DYKDDDDK) 中の D4 配列認識にともなう近接効果を利用した。この D4 配列認識を利用して、タグ配列中の Lys 残基に対し金属錯体中に導入したチオエステル反応部位を近接させることで、側鎖アミンへの S→N アシル転移による標識を検討した。FLAG タグを導入したユビキチン(Ubi)に対して本手法を適用したところ、蛍光色素を導入した DpaTyr/2Ni-チオエステル型プローブを添加するだけで、FLAG タグを導入したユビキチンに対する選択的なラベル化反応が進行した。プロテアーゼ処理により FLAG タグ部位を切り離した結果、FLAG タグ部位に対する修飾であることが、SDS-PAGE, MALDI-TOF-MS 測定により明らかとなった。Biotin を導入した DpaTyr/2Ni-チオエステル型プローブを用いることで、3xFLAG タグを導入した細胞表層の受容体タンパク質の蛍光標識にも成功した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、リン酸基や連続するアスパラギン酸と選択的に結合可能な二核金属錯体 (Dpa/Metal) 構造をもとに、生体内リン酸種やタンパク質の機能解析を行うための分子ツールを開発した成果についてまとめたものである。主な成果は次の通りである。

1. ATP などの生体内リン酸アニオンを選択的に蛍光レシオメトリーにより検出可能な蛍光プローブ分子の開発をおこなった。リン酸認識部位としての Dpa/Zn 錯体構造と蛍光部位としてのキサントンを組み合わせた蛍光プローブ分子を用いることで、レシオメトリーによるリン酸誘導体のセンシングに成功した。
2. タンパク質に遺伝子レベルで導入されたアニオン性のアスパラギン酸ペプチドタグ配列 (D4) と、その配列と選択的に相互作用するプローブ分子 (DpaTyr/2Zn) を用いた新規共有結合形成型のタンパク質標識システムの開発をおこなった。本標識法では分子認識による選択性と化学反応の選択性を相乗的に組み込むことで、高い選択性と安定な共有結合による標識を可能にした。実際に開発した標識システムを用いて生細胞表層の受容体タンパク質の選択的な標識に成功し、受容体の脱感作現象などの蛍光イメージングに成功した。
3. 分子生物学でタンパク質の検出や精製に用いられる FLAG タグへの共有結合型標識手法の開発をおこなった。これは FLAG タグ配列を DpaTyr/2Ni 錯体により選択的に認識し、FLAG タグ配列中のリジン側鎖のアミンへアシル転移する修飾法である。この標識法を用いることで、選択的な FLAG タグつきタンパク質の化学標識が可能であった。

本論文は、上記の通り、Dpa 金属錯体による生体アニオン種への選択的認識を利用して生体内リン酸種やタンパク質の機能解析を行うための新規な分子ツール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21年12月16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。