

京都大学	博士（工学）	氏名	田村 朋則
論文題目	Endogenous protein imaging and analysis in living cells by selective chemical labeling methods (選択的化学修飾による細胞内在性蛋白質の相互作用解析とイメージング)		
(論文内容の要旨)			
蛋白質の化学修飾は、生命現象を解明するための分子ツールを作り出すことの出来る強力な手法である。蛍光色素や光反応基といった合成小分子を細胞内に存在する標的蛋白質に選択的に導入できれば、蛋白質の機能を解析する上で有用であると考えられる。本論文は、細胞内の標的蛋白質に対する特異的化学修飾法の開発と、それらに応用した蛋白質間相互作用およびイメージング解析を行った結果をまとめたものであって、4章からなっている。 第1章では、細胞内において標的蛋白質を選択的に化学修飾するための手法としてリガンド指向型トシル化学（LDT chemistry）の開発を行った。本手法はアフィニティーラベルの反応基にトシル基を用いることで、ラベル化と同時にリガンド部位が切り離されるため蛋白質を失活させることなく標的選択的なラベル化が可能である。本手法を免疫抑制に関与する蛋白質である FKBP12 に適用し、LDT ラベル化剤の構造最適化を行ったところ、リガンドと反応基を結ぶスパーサー骨格がラベル化効率およびラベル化部位に大きく影響することを見出した。この結果はリガンド指向型ラベル化試薬の一般的な設計指針として極めて重要な知見となった。また、これらの検討から、LDT 化学においては、蛋白質表層のグルタミン酸、ヒスチジン、チロシンが反応し得ることを明らかとした。次に、最適化した LDT ラベル化剤をヒトリンパ球由来細胞である Jurkat 細胞に添加した所、細胞内に内在的に発現している FKBP12 を高選択的にビオチン標識することに成功した。以上のように本章では LDT 化学の基礎的反応特性を明らかにし、本手法が細胞内蛋白質ラベリングのための有用な手法であることを示した。 第2章では、第1章にて開発した LDT 化学を発展させ、細胞内在性蛋白質の蛋白質間相互作用解析を行った。LDT 化学は蛋白質の活性を損なうことなく、望みの分子プローブを蛋白質のリガンド結合サイト近傍に特異的に導入できるという利点を有する。この特長を活かし、LDT 化学により細胞内在性の蛋白質に光反応基を導入し、細胞内で起こる蛋白質間相互作用を光架橋捕捉することを試みた。本手法を実証するために、モデル蛋白質として引き続き FKBP12 を選択した。FKBP12 は免疫抑制剤である rapamycin あるいは FK506 を介して、それぞれ FRB または Calcineurin(Cn)と三者複合体を形成することが知られている。まず初めに、光反応基として Diazirine(Daz)を、検出タグとしてビオチンを有する LDT ラベル化剤を合成した。試験管内にて Daz を修飾した FKBP12 に、rapamycin および FRB を添加後、光照射を行い、ウェスタンブロットにより評価した所、FKBP12 と FRB の光架橋産物が検出された。同様に FK506 および Cn 存在下では FKBP12 と Cn の光架橋産物が得られた。更に HeLa 細胞内において、LDT 化学によって内在性 FKBP12 のみに Daz を特異的に導入し、一過的に発現させた FRB との rapamycin 依存的蛋白質間相互作用を光架橋検出することを検討した。その結果、細胞内で起こる FKBP12-FRB 間相互作用を光架橋によって検出することに成功した。本手法は細胞内在性蛋白質が関与する蛋白質間相互作用を解析できる有用な手法であり、従来の遺伝子操作を施した細胞では評価できなかった天然の生命現象を解明する			

京都大学	博士 (工学)	氏名	田村 朋則
ための足がかりになると期待される。 第3章では LDT 化学による FKBP12 の蛍光ラベル化を行った。蛍光色素として Oregon Green(OG)を有する LDT ラベル化剤を合成し、これを FKBP12 と反応させた。このようにして得られた OG 修飾 FKBP12 溶液に、リガンドであるラパマイシンやその誘導体を添加すると、OG 由来の蛍光強度が大きく減少した。その溶液に、FKBP12-ラパマイシン複合体と相互作用する蛋白質である FRB を添加すると、蛍光強度は元の値まで回復した。このことから LDT 化学を用いて FKBP12 に蛍光色素を部位特異的に導入することで、リガンドの結合およびそれに続く蛋白質間相互作用を蛍光強度変化でモニタリング可能な蛍光レポーターを構築可能であることが示された。また、LDT 化学によって細胞内在性 FKBP12 に OG を選択的に導入することで、赤色蛍光蛋白質を融合した FRB との相互作用を in-cell FRET 解析することに成功した。この結果から、LDT 化学による内在性蛋白質化学修飾と既存の蛍光蛋白質標識技術を組み合わせることで、内在性蛋白質の機能や動態をイメージング解析可能であることが示された。 第4章では細胞膜蛋白質を解析するための新規ラベル化法の開発を行った。具体的には、アシル転移触媒である DMAP(4-dimethylaminopyridine)に脂質を連結した Biomembrane-embedded DMAP (BeD)を合成した。これを細胞形質膜に配置・濃縮し、触媒反応を膜表面に制限することで膜蛋白質の選択的かつ効率的なラベル化を試みた。初めに、膜蛋白質の多くが同定されている赤血球膜に BeD を導入した。ここにフルオレセインをプローブとして有するチオエステル型アシルドナーを添加して反応を行ったところ、触媒的アシル転移反応が進行し、高度に糖化された膜蛋白質である PAS-1 が選択的にラベル化されることがわかった。次に、生きた Jurkat 細胞に BeD を添加し同様の反応を行ったところ、BeD 存在下においてのみ複数の膜蛋白質がラベル化されることがわかった。興味深いことにラベル化された蛋白質のほとんどは TritonX-100 不溶性画分に存在し、脂質ラフト関連蛋白質であることが示唆された。続いてラベル化後の細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、ラベル化蛋白質の膜局在は GM1-enriched raft 染色プローブ(CT-B)のそれと一致し、細胞膜ミクロドメインに存在する蛋白質が選択的にラベル化されることが明らかとなった。またラベル化後の細胞を経時観察したところ、ラベル化される蛋白質は遊走時において細胞の後方(uropod)に集積することが判明した。このような膜ドメイン選択的な反応が起こるメカニズムを調べるために、蛍光色素標識した BeD を合成しその細胞膜局在を調べたところ、BeD 分子そのものが膜ドメインに局在することが分かった。これらの結果より、本手法では細胞膜ドメインに DMAP 触媒が集積することで、同じ膜ドメインに存在する蛋白質を選択的にラベル化するというユニークな反応特性を有していることが明らかとなった。さらに二次元電気泳動、免疫染色および質量解析から本手法によってラベル化される主な蛋白質は、β-tubulin であることを明らかにした。以上の結果から、本手法は細胞膜ドメインに存在する蛋白質の特異的解析ツールとしての展開が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞内の標的蛋白質に対する特異的化学修飾法の開発と、それらを応用した蛋白質間相互作用検出およびイメージング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. 細胞内において標的蛋白質を選択的に化学修飾するための手法としてリガンド指向型トシル化学 (LDT chemistry) の開発を行った。本手法を FKBP12 に拡張し、LDT ラベル化試薬の構造最適化および反応特性の評価を行い、リガンドと反応基を結ぶスパーサー骨格がラベル化効率およびラベル化部位に影響することを見出した。また最適化した LDT ラベル化剤を用いて Jurkat 細胞の内在性 FKBP12 を高選択的にラベル化することに成功した。
2. LDT 化学を応用して細胞内 FKBP12 に光クロスリンカーを導入し、蛋白質間相互作用の光クロスリンク検出を行った。その結果、FKBP12 の相互作用相手である FRB を発現した HeLa 細胞内において FKBP12-FRB 間の相互作用を特異的に光架橋検出することに成功した。
3. LDT 化学によって試験管内で FKBP12 に蛍光色素を導入することで、小分子リガンドの結合およびそれに続く蛋白質間相互作用を蛍光変化で読み出すことのできるバイオセンサーを構築した。また細胞内での FKBP12 の蛍光ラベル化にも成功し、これを利用して FKBP12-FRB 間相互作用を FRET イメージングすることに成功した。
4. 細胞膜蛋白質を解析するための新規ラベル化ツールとして膜担持型 DMAP 触媒の開発を行った。これによって赤血球膜上でラベル化反応を行ったところ、膜上で触媒的アシル転移反応が進行し、高度に糖化された膜蛋白質 PAS-1(glycophorinA dimer)の選択的ラベル化に成功した。次に Jurkat 細胞において同様の反応を行うと、脂質ラフト膜表層の tubulin- β が特異的にラベル化されることを見出した。このような膜ドメイン選択的な反応は膜担持型触媒分子そのものが膜ドメインに局在することによって起こることを明らかにした。また顕微鏡観察から膜表層 tubulin- β は細胞遊走時には細胞後方に集積することを初めて見出した。

本論文は上記の通り、細胞内在性蛋白質の選択的な化学修飾およびそれを利用した内在性蛋白質の相互作用検出およびイメージング解析を行っており、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25年2月22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。