

Title	Development of Novel Chemical Approaches for Detection and Engineering of Endogenous Proteins(Digest_要約)
Author(s)	Matsuo, Kazuya
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-03-24
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18302
Right	学位規則第9条第2項により要約公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

京都大学	博士 (工 学)	氏名	松尾 和哉
論文題目	Development of Novel Chemical Approaches for Detection and Engineering of Endogenous Proteins (内在性蛋白質の検出およびエンジニアリングのための新規化学的手法の開発)		
(論文内容の要旨)			
<p>種々の生命現象において中心的な役割を果たす蛋白質の機能を解析することは、生命現象の解明や新たな疾病治療の開発に繋がる重要な科学技術である。特に遺伝子工学的な手法を使用せず、天然に存在する蛋白質をそのままの形で解析するには、化学的な手法が極めて有効であると考えられるが、そのような手法の確立は未だ不十分である。本論文は、内在性蛋白質の機能解析およびエンジニアリングを可能にする新たな化学的手法の開発に関してまとめたものであって、3章からなっている。</p> <p>第1章ではフッ素核 (^{19}F) の核磁気共鳴画像法 (^{19}F-MRI) を用いて turn-on 型で酵素活性を検出可能な自己会合型分子プローブを開発した。親水性の酵素基質に ^{19}F 部位を導入し、自己会合を誘起するための長鎖アルキル基を連結した両親媒性会合型プローブは、水中で自己会合体を形成し、^{19}F シグナルは OFF 状態となる。酵素によって基質部位が変換され、アルキル基が触媒的に切断されると、会合体が崩壊し、^{19}F シグナルは ON 状態となる。このシグナルスイッチング機構はニトロ基還元酵素を用いて実証され、癌関連酵素である matrix metalloproteinase (MMP) の検出系へと展開された。MMP 活性の ^{19}F プローブは、水中において約 500 nm の会合体を形成し、わずか 0.5 nM の MMP 濃度でも turn-on 検出することに成功した。これは従来の蛋白質検出型 ^{19}F プローブと比較して、10,000 倍高感度化したことになる。さらに、このシグナル増幅型 ^{19}F プローブを利用し、種々の培養細胞から分泌されるごく微量の MMP 活性を特異的に検出できた。以上より、分子の自己会合に基づく ^{19}F プローブを用いることで、標的酵素特異的に ^{19}F-MRI で解析する手法の開発に成功した。</p> <p>第2章では蛋白質の化学修飾を利用したケージド酵素の一段階構築を行った。蛋白質の化学修飾 (ラベル化) は、内在性蛋白質をエンジニアリングするのに有用な手法である。リガンド指向型 Acyl Imidazole 化学 (LDAI 化学) は Acyl Imidazole を脱離型反応基とし、内在性蛋白質に対して oxycarbonyl 結合を介したラベル化が可能である。また、ラベル化が起こると同時にリガンド部位が切り離されるため、標的蛋白質の活性は維持される。この LDAI 化学を利用し、ヒト赤血球内に存在する炭酸脱水酵素 (CA) のラベル化を検討した。蛍光色素である 7-diethylaminocoumarin を有するラベル化剤では CA の活性中心近傍の複数のアミノ酸残基に修飾が確認されたのに対し、フッ素を有するラベル化剤は、CA 内の Ser3 特異的に定量的な修飾が進行することを見いだした。この特徴的なラベル化は、赤血球ライセートのような夾雑系においても特異的に進行した。これを利用し、赤血球ライセート中の CA の酵素活性を光ケージド化した。通常、LDAI 化学では蛍光色素などのプローブ分子を標的蛋白質に修飾するが、本系では逆に阻害剤を、光ケージド基を介して定量的に CA に修飾することで、ケージド CA の構築を行った。阻害剤が修飾された状態であるケージド CA は酵素活性を示さないが、光照射するとケージド基が分解し、阻害剤が遊離することで天然型 CA とほぼ同等の酵素活性を示した。したがって、本手法は夾雑系において内在性酵素を特異的</p>			

京都大学	博士 (工 学)	氏名	松尾 和哉
<p>に化学修飾し、一段階で光ケージド化できる酵素エンジニアリング手法であると言える。</p> <p>第3章では生細胞中に発現する種々の内在性蛋白質を特異的にスルホニル化可能なリガンド指向型 <i>N</i>-Sulfonyl Pyridone 化学 (LDSP 化学) を開発した。生細胞は多数の小分子や蛋白質、核酸、脂質、糖質などが混在する極めて複雑な系である。その中で標的蛋白質のみを特異的にスルホニル化するため、アフィニティーラベル化の新規反応基として <i>N</i>-Sulfonyl Pyridone 誘導体を見いだした。この <i>N</i>-Sulfonyl Pyridone 型ラベル化剤は、標的蛋白質のリガンド認識に伴う近接効果によって、求核性アミノ酸残基の特異的なスルホニル化が起こると同時に、リガンド部位が切り離される。精製 CA1 および CA2 を用いて、試験管レベルでのラベル化を評価したところ、リガンド認識駆動での効率的なラベル化が進行し、リガンド結合部位近傍の Tyr や Lys への修飾が確認された。さらに、生細胞系での蛋白質ラベリングを検討したところ、MCF7 細胞内の細胞質全体に分布する CA2 のラベル化では、他のリガンド指向型化学であるリガンド指向型 Tosyl 化学や LDAI 化学と比較して、特異的かつ効率的なラベル化が進行することが示された。また、ラベル化剤のリガンド部位を種々変更することで、MCF7 細胞膜上の CA12、KB 細胞膜上の葉酸受容体、A431 細胞膜に存在する上皮成長因子受容体のキナーゼドメイン (細胞内ドメイン)、特定のオルガネラに分布し、炎症性刺激によって発現誘導される RAW264.7 細胞内のシクロオキシゲナーゼ-2 の特異的なラベル化に成功した。以上から、LDSP 化学は様々な細胞内在性蛋白質を特異的かつ迅速にスルホニル化可能な手法であり、標的蛋白質の機能を正しく理解するための有用な手法なると期待される。</p>			