



Title	Visualization and Functional Control of Proteins in Living Cells by Using BL-tag Technology
Author(s)	吉村, 彰真
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34437">https://doi.org/10.18910/34437</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏名 (吉村 彰真)

論文題名

Visualization and Functional Control of Proteins in Living Cells by Using BL-tag Technology  
(BL-tagテクノロジーを用いた生細胞におけるタンパク質の可視化と機能制御)

## 論文内容の要旨

本博士論文では、変異体 $\beta$ -ラクタマーゼタグ (BL-tag) システムを用いて、多角的なタンパク質研究ツールの開発を行った。序論、第1章～第3章、結論および展望により構成される。

序論では、BL-tagシステムを用いた標的タンパク質の機能性小分子による標識について概説した。

第1章では、BL-tagシステムを用いて標的タンパク質のビオチン化を行い、ストレプトアビジン修飾の蛍光性量子ドットおよびMRIの陰性造影剤であるSPIOを導入することによって、蛍光だけでなくMRIも用いた多角的な標的タンパク質のイメージングを行った。

第2章では、BL-tagシステムを用いて細胞内タンパク質の1分子イメージングを行った。

第2.1節では、1分子イメージングを行うためのプローブ開発に取り組んだ。過去に開発された細胞膜透過性プローブが、細胞内に非特異的に蓄積するという問題があったので、その構造最適化を行った。水溶性のリンカーを分子に導入することによって細胞内局在を向上させ、1分子イメージングにも応用可能なプローブの開発を行った。

第2.2節では、免疫系のシグナル伝達に関わるタンパク質を標的として、シグナルの活性化によってタンパク質間相互作用が引き起こされた際の分子挙動の変化を、1分子イメージングによって解析した。

第3章では、生細胞に発現するタンパク質の機能制御を行った。

第3.1節では、BL-tagシステム、既存のHaloTagシステムと2つのタンパク質間を繋ぐ分子であるDimerizerを組み合わせることによって、生細胞内に発現するタンパク質の二量体形成を達成し、その機能を制御するための技術を開発した。

第3.2節では、第3.1節で確立したタンパク質二量体を形成させるシステムを用いて、上皮成長因子受容体 (EGFR) の機能制御を試みた。Dimerizerを用いることによってEGFRの二量体形成を誘導し、EGFRの細胞内ドメインに存在する特定のチロシン残基のリン酸化を誘導し、それに続く下流シグナルの活性化を行った。

第3.3節では、タンパク質機能の時空間的制御を可能とするシステムの開発を行った。Dimerizerに光感受性保護基を導入することによって、タンパク質二量体形成の照射による制御を試みた。このシステムを用いて、EGFRの活性化および細胞シグナル活性化を照射によって制御した。

結論において、以上の成果を総括し、今後の展望について記した。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 吉 村 彰 真 )			
	(職)	氏	名
論文審査担当者	主 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	金谷 茂則
	副 査	教授	福住 俊一
	副 査	教授	伊東 忍
	副 査	教授	高井 義造
	副 査	教授	渡部 平司
	副 査	教授	兼松 泰男

## 論文審査の結果の要旨

本博士論文は、変異体  $\beta$ -ラクタマーゼを用いたタンパク質ラベル化技術、BL-tag システムを応用した多角的なタンパク質研究ツールの開発に関して述べられたものである。これまでに開発してきた BL-tag システムは、標的となるタンパク質を単に蛍光標識するだけであったが、本論文では蛍光にとどまらないタンパク質標識や蛍光標識したタンパク質のより詳細な解析法への応用、さらにはタンパク質の機能を制御するシステムへも応用しており、非常に独創的な研究である。以下に本論文の主な成果を要約する。

第 1 章では、標的タンパク質を蛍光と核磁気共鳴イメージング (MRI) を用いた検出を可能とする、多角的なイメージング法の開発について述べられている。BL-tag システムを用いた標的タンパク質のビオチン化を達成し、これをストレプトアビジン修飾の機能性分子と組み合わせることによって、生細胞に発現する標的タンパク質を蛍光、さらには MRI によって検出することに成功している。

第 2 章では、詳細なタンパク質解析を可能とする 1 分子イメージングへの BL-tag システムの応用について述べられている。まず第 2.1 節では、分子デザインを工夫することによって 1 分子イメージングへと応用可能な BL-tag ラベル化プローブを開発している。そして、第 2.2 節では開発したプローブを用いて 1 分子イメージングを用いた免疫系タンパク質の解析を行っている。これにより、これまでの共焦点蛍光顕微鏡等を用いた解析では検出できなかった、細胞内シグナル伝達におけるタンパク質の分子挙動の変化を検出することに成功している。

第 3 章では、BL-tag システムを用いた標的タンパク質の機能制御への応用について述べられている。第 3.1 節では、BL-tag と既存のタンパク質ラベル化システムを組み合わせることによって、生細胞に発現する標的タンパク質の二量体化を達成している。第 3.2 節では、上皮成長因子受容体 (EGFR) の機能制御について述べられている。EGFR の二量体化を誘導することによって、EGFR の活性化、さらにはそれに続く細胞内の下流シグナル伝達の活性化に成功している。そして、第 3.3 節ではタンパク質二量体形成を光によって誘導できるシステムの開発について述べられている。このシステムを用いて、EGFR の活性化を光照射によって制御することに成功している。

以上のように、本論文は適切な分子設計を通して、生細胞に発現するタンパク質を多角的に研究する化学ツールの開発を達成している。特に光によるタンパク質活性化システムは非常に独創的であり、今後、狙った箇所が存在する特定のタンパク質のみを定量的に活性化することも可能になると期待できる。この技術によって、これまでのイメージング実験では捉えきれなかった様々な生命現象の解明につながり、生物学分野においてブレイクスルーを生み出すことが大いに期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。