



Title	Multicolor Fluorogenic Probes Designed for Analysis of Protein Translocation in Living Cells
Author(s)	平山, 真也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55910
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

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 (平山 真也)	
論文題名	Multicolor Fluorogenic Probes Designed for Analysis of Protein Translocation in Living Cells (マルチカラー発蛍光プローブによる蛋白質動態解析技術の開発)
論文内容の要旨	
<p>細胞内には、メンブレントラフィックと呼ばれる分子輸送システムが存在し、様々な蛋白質の動態をダイナミックにかつ適切に制御している。特に、膜蛋白質の細胞内動態は、細胞外からの物質の取り込みや細胞膜の恒常性に大きく貢献している。しかしながら、複雑なネットワークを形成する膜蛋白質動態については未だ不明な点が多い。このため、その機構を解明する方法として、膜蛋白質動態を直接生細胞で解析できるイメージング技術の開発が求められていた。</p> <p>本博士論文では、Photoactive yellow protein タグ(PYPタグ)をラベル化すると蛍光性となる「発蛍光プローブ」の開発及びグルコーストランスポーター4 (GLUT4) の細胞内動態解析への応用について述べる。</p> <p>第1章では、発蛍光プローブの反応速度向上について述べる。PYPタグとプローブとの静電相互作用に着目し、PYPタグの表面電荷を調節した変異体を作製した。また、プローブ内の脱離基のp<i>K</i>_aに着目し、脱離能を向上させた新たな発蛍光プローブを開発した。これらの技術改変により、生細胞中の標的蛋白質をわずか1分でラベル化できることが示された。</p> <p>第2章では、長波長蛍光を発する新たな発蛍光プローブの開発について述べる。ジニトロベンゼンが効果的な消光基として働くことを見出し、優れた蛍光特性を有した長波長発蛍光プローブの開発に成功した。これらの発蛍光プローブを用いることで、標的蛋白質の洗浄操作なしのイメージングに成功した。これまでに、長波長発蛍光プローブの開発のための汎用性のあるストラテジーはなく、本研究により、長波長発蛍光プローブ開発の新たな指針が示された。</p> <p>第3章では、GLUT4の動態のイメージング及び糖鎖機能の解明について述べる。GLUT4は、インスリン刺激により細胞内部から細胞膜へと移行し、血中グルコースを細胞内へと取り込む。その動態の異常は二型糖尿病に深く関与するため、詳細な機構解明が望まれていた。しかしながら、GLUT4の動態に対する糖鎖の役割は諸説あり、未だ明確になっていない。そこで本章では、これまでに開発したPYPタグラベル化技術を応用し、GLUT4動態の解明に取り組んだ。第2章で開発した細胞膜非透過性の発蛍光プローブを用いることで、細胞膜へと移行してきたGLUT4のみを選択的にリアルタイムにイメージングできることが示された。さらに、糖鎖構造を変化させたGLUT4の細胞内動態との違いを評価し、糖鎖が細胞膜上でのGLUT4の保持に関与していることを初めて明らかにした。</p> <p>結論では、以上の結果について総括し、今後の展望について記した。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (平山 真也)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 菊地 和也
	副査 教授 伊東 忍
	副査 教授 大政 健史
	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、メンブレントラフィックにおける膜蛋白質の細胞内動態を解析するための発蛍光プローブの開発について述べられたものである。これまでに開発されてきたPhotoactive yellow protein タグ(PYPタグ)ラベル化技術は、蛋白質の高速標識及び長波長化という課題を有していた。本論文はこれらの課題を克服した新たな発蛍光プローブを開発し、グルコーストランスポーター4 (GLUT4) の細胞内動態解析へと応用することで、GLUT4動態に対する糖鎖機能を解明した研究である。序論、第1章～第3章、結論及び展望により構成されており、以下に本論文の主な成果を要約する。

第1章では、蛋白質の標識速度向上のためのPYPタグ変異体の開発及び新規発蛍光プローブの開発について述べている。PYPタグ変異体は、PYPタグ表面の塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸へと変異することで、アニオン性プローブとの静電引力による反応速度の向上に向けて作製されている。新規発蛍光プローブは、プローブ内のチオフェノール基のpK_aに着目し、脱離能を向上させる目的で開発されている。開発したPYPタグ変異体と発蛍光プローブを組み合わせることにより、標的蛋白質をわずか1分で検出することに成功している。

第2章では、マルチカラーメーティングのための長波長発蛍光プローブの開発について述べられている。長波長蛍光色素を効果的に消光できる消光基の検討を行い、波長に依存しない様々な蛍光色素を消光可能なジニトロベンゼンを見出している。そして、ジニトロベンゼンの導入により優れた蛍光特性を有した新たな長波長発蛍光プローブが開発され、細胞膜や細胞内に発現させた蛋白質の無洗浄イメージングに成功している。

第3章では、発蛍光プローブを用いたGLUT4動態のイメージング及び糖鎖機能の解明について述べられている。第2章で開発された細胞膜非透過性の発蛍光プローブを用いることで、細胞内部に存在するGLUT4を標識することなく、インスリン刺激に応答して細胞膜へと移行したGLUT4のみを選択的にイメージングすることに成功している。さらに、糖鎖構造を変化させたGLUT4の細胞内動態との違いを評価し、糖鎖が細胞膜上でのGLUT4の保持に関与していることを論理的に示している。

以上のように、本論文は長波長発蛍光プローブ開発における有力な設計指針を示し、その指針に基づいて適切に設計された発蛍光プローブを用いて生物学研究の分野における新たな知見を見出している。特に、一過的に膜移行する蛋白質を標識し、その後の動態を辿る技術はこれまでに報告されておらず、タグ蛋白質による蛍光イメージングの価値を広げた極めて独創的な研究であると言える。今後、GLUT4に留まらず、様々な膜蛋白質の細胞内動態解析への応用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。

最終試験の結果の要旨及び担当者

氏 名 (平山 真也)	
	職 名 氏 名
最終試験担当者	主査 教授 菊地 和也
	副査 教授 伊東 忍
	副査 教授 大政 健史
	副査 教授 高井 義造
	副査 教授 渡部 平司
	副査 教授 兼松 泰男

最終試験の結果の要旨

本学学位規程第10条の規定により、学位申請者に対して学位論文を中心とし、論文内容及びこれに関連のある科目について試問を行い、審査委員全員の協議の結果、平成 28年 2月 12日合格と判定した。