The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Fluorogenic Protein Labeling System Based on Non-catalytic β-Lactamase (BL-tag)
Author(s)	渡辺, 修司
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58364
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【53】

氏　　名	渡　辺　修　司（わたなべ しゅうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　２４５３８　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学　位　論　文　名	Fluorogenic Protein Labeling System Based on Non-catalytic β-Lactamase(BL-tag) (変異体β-ラクタマーゼ(BL-tag)をタグとする発蛍光型タンパク質ラベル化システム)
論　文　審　査　委　員	(主査) 教　授　菊地　和也 (副査) 教　授　福住　俊一　　教　授　金谷　茂則　　教　授　宮田　幹二 教　授　伊東　　忍　　教　授　高井　義造　　教　授　伊東　一良 教　授　渡部　平司　　教　授　兼松　泰男

論文内容の要旨

本博士論文では変異体β-ラクタマーゼをタグとする新規タンパク質ラベル化システムの構築を目的とした。

まず Introduction において生命科学研究におけるタンパク質ラベル化法の意義を概説した。

第１章ではβ-ラクタマーゼの加水分解機構を検討し、脱アシル化に重要な役割を果たすアミノ酸に変異を入れることで、アシル-酵素中間体が安定に存在することを in vitro において確認した。

第２章では第１章で作成した変異体β-ラクタマーゼ(以後、BL-tag と表す)をラベル化するプローブとしてクマリンを蛍光色素として持つ分子を作成した。プローブ中に消光色素を組み込み、BL-tag との反応によって消光色素が脱離するよう分子デザインを施した。そして様々な解析を行い、プローブと BL-tag との反応性を確認した。その後、細胞膜上に発現した BL-tag 融合タンパク質との特異的ラベル化を検討した。

第３章では開発した BL-tag ラベル化システムの汎用性を広げるためにラベル化プローブの多色化を行った。クマリンよりも蛍光特性が優れた色素を導入することで、S/N 比の向上を行った。また、他の小分子ラベル化システムと併用することで細胞のマルチラベルを行い、それと共にラベル化条件を詳細に検討することでラベル化プローブの問題点を洗い出した。

第４章では BL-tag の目的タンパク質に与える影響を免疫抗体法、蛍光イメージングなどで検討し、目的タンパク質として用いた膜タンパク質の挙動を解析した。

第５章では第３章で浮き彫りとなった問題点を解決するため、分子デザインの再検討を行った。消光色素、脱離基の最適化を行うことで、ラベル化反応速度を大幅に向上させ、未反応プローブの洗浄を行う事無く、目的タンパク質の高感度ラベル化を達成した。

第６章では細胞膜表面に限られていた適用範囲を細胞内に拡張するために、極性官能基をエステル保護し、膜透過性を向上させたラベル化プローブを開発した。ラベル化プローブの高い細胞内集積性を利用することで、細胞内タンパク質のラベル化の経時変化を観察した。またエステル保護による分子認識の変化を利用し、細胞内外に存在する標識対象タンパク質を同一タグにより同時にラベル化可能である事を示した。

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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、特異性が高く、細胞洗浄を必要としない汎用的な新規小分子タンパク質ラベル化システムの開発を目的とし、タグタンパク質とラベル化プローブ、両観点から系統的な最適化を行っている。主な成果は次のように要約される。

第１章では新規タンパク質ラベル化システムのタグタンパク質として変異体β-ラクタマーゼ（BL-tag）の導入を考案し、in vitro においてラベル化特性を確認している。

第２章ではクマリンを蛍光団として持ち FRET 機構に基づく発蛍光性ラベル化プローブを開発し、生細胞上での特異的蛍光ラベル化に成功している。

第３章では本ラベル化システムの更なる汎用性を示すために、フルオレセイン、ローダミンを蛍光団として持つラベル化プローブを作成し、それらのプローブを用いて BL-tag 融合タンパク質のラベル化を確認している。そして市販のタグシステムと組み合わせる事で、細胞中の複数のタンパク質を同時かつ特異的に蛍光ラベル化できることを示している。

第４章では BL-tag 導入による標的膜タンパク質挙動への影響を、インターナリゼーション活性等を観察することで見積っている。その結果 BL-tag 導入後も標的膜タンパク質の機能が保たれていることを確認している。

第５章では新規発蛍光性ラベル化プローブとしてアゾピリジンを脱離基として有する FCAPO2 を合成している。FCAPO2 は BL-tag とのラベル化に伴う優れた蛍光応答性を示し、未反応プローブを取り除く事無く標的タンパク質を特異的かつ迅速に可視化することに成功している。また FCAPO2 は分子内塩を形成させることで膜透過性を有しており細胞内タンパク質のラベル化にも成功している。

第６章ではβ-ラクタムのプロドラッグを用いることで優れた細胞膜透過性を有するラベルプローブを開発している。その高い細胞内集積性を利用することで細胞洗浄操作を行う事無く、細胞内タンパク質の特異的ラベル化に成功している。

以上のように本論文は変異体β-ラクタマーゼをタグとし、ラベル化プローブの FRET 機構や細胞内集積性を制御することで特異的かつ細胞洗浄不要なタンパク質ラベル化システムを初めて報告している。本ラベル化システムは蛍光にとどまらず、MRI などの機能性分子にも応用が可能である。今後、本博士論文の成果により、様々な生命現象の解明につながる事が期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。