



Title	Development of a versatile domain mapping system for intermediate-resolution electron microscopy using a portable peptide tag
Author(s)	Brown, Zuben Patrick
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69648
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 (Zub en Patrick Brown)	
論文題名	Development of a versatile domain mapping system for intermediate-resolution electron microscopy using a portable peptide tag (電子顕微鏡観察における新規蛋白質ラベリングシステムの開発)
論文内容の要旨	
<p>Electron microscopy (EM) can be used to obtain the three dimensional structural information of macromolecular complexes. When data are obtained at a sufficiently high (approx. 3 Å) resolution, one can build atomic models of the complexes with relatively high accuracy. In contrast, when the EM images are collected at lower resolutions, even the identity of domains and subunits may be unclear. Gene fusion technologies are available to label subunits or domains to enable positional mapping by comparisons between the wild type and the mutated construct, but artificial fusion of protein domains within a target polypeptide may cause unwanted structural alterations. Exogenous labeling by Fab fragments from antibodies can bypass this complication because it does not require genetic modifications on the target protein. However, it requires a panel of high-affinity antibodies that recognize a wide variety of epitopes, making this method highly costly. Alternatively, insertion of small linear peptide tags into the target protein and then binding the Fab from the cognate antibody can be used. This, too, has limitation because standard peptide tag systems usually require their placement in terminal regions of a protein, reducing the versatility of the mapping. The recently developed PA dodecapeptide epitope tag (GVAMPGAEVV), forms a tight β-turn in the antigen binding pocket of its antibody (NZ-1), which allows for the epitope to remain reactive even when inserted into surface-exposed loops within central domains of various proteins. As a test case for EM labeling with PA tag and NZ-1 Fab, a multi-domain cell adhesion receptor αIIbβ3 integrin was chosen and I generated several different constructs with PA tag inserted centrally with the αIIb -subunit. I confirmed that the purified PA-tagged integrin ectodomain fragments form a stable complex with NZ-1 Fab, a property that is necessary for a successful EM label. Furthermore, the negatively stained EM images showed that a majority of the particles exhibited a clear density corresponding to the NZ-1 Fab. The positions of the bound Fab were also in good agreement with the predicted location of the inserted PA tag. The high affinity and insertion compatibility of the PA tag system allows for its use as a new EM labeling methodology applicable to proteins for which good antibodies are not available.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Zuben Patrick Brown)			
論文審査担当者	主査 副査 副査 副査	(職)	氏名
		教授	高木 淳一
		教授	難波 啓一
		教授	中川 敦史
		教授	上田 昌宏

論文審査の結果の要旨			
<p>電子顕微鏡イメージングは生体高分子の立体構造情報を得る方法として近年その威力を発揮しつつあるが、光学顕微鏡イメージングと異なり「色情報」が無いために、特定のドメインやサブユニットを標識することが困難である。遺伝子融合により外來性の「ラベル」を導入することはできるが、ラベル自体がターゲット分子の形状を変えてしまうため理想的でない。抗体のFabフラグメントで標識することで任意のタイミングでラベルすることは可能になるが、そのためにはターゲット分子ごとに高親和性の抗体が必要で有り、これも現実的でない。本論文は、ヒトポドプラニンに対する高親和性抗体 NZ-1 が認識するペプチド(PA タグ)がタンパク質のループ領域に挿入できることを利用して、PA タグを電顕イメージングに応用し、これが優れたドメインラベル法を構築できることを証明した。特に、非常にフレキシブルで解析が困難なマルチドメインタンパク質であるインテグリンの複数の場所に PA タグを挿入し、それらが NZ-1 の Fab と安定な複合体を形成できること、そして結合した Fab の明瞭な密度が単粒子解析によって観察され、それによって PA タグ導入位置が明確に決定できることを示した。本法はこれまで極めて限られていた電顕イメージングにおけるドメインラベル法として簡便かつ汎用性の高いものであり、よって、本論文は博士(生命機能学)の学位論文として十分価値あるものと認める。</p>			