The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Development of Genetically Encoded Monomeric Green Photosensitizer for Light-inducible Protein Inactivation and Cell Ablation
Author(s)	Riani, Yemima Dani
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70742
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （Yemima Dani Riani）	
Title	Development of Genetically Encoded Monomeric Green Photosensitizer for Light-inducible Protein Inactivation and Cell Ablation (光刺激によりタンパク質不活性化及び細胞死を誘導するための遺伝子コードされた単量体型光増感緑色蛍光タンパク質の開発)

Abstract of Thesis

Introduction

In order to get better understanding of a biological system, one of many questions often addressed in research is: "What is the function of particular of protein/cell function within cell/organism?" A well-established method to answer that question is by analyzing the loss-of-function phenotype. Currently available methods, such as gene knockout, knockdown, toxin- or laser-mediated cell ablation, have drawbacks to achieve high precision of target inactivation/ablation in spatiotemporal controlled manner. Photosensitizer, which is chromophore that generates ROS (Reactive Oxygen Species) upon light irradiation, had shown its great performance to perform such task. Due to its reactivity and limited diffusion range, ROS projected to target will immediately attack and inactivate target specifically by oxidation with highest precision to be less than subcellular range.

Chapter 1: Engineering a monomeric photosensitizer protein for photo-inducible protein inactivation and cell ablation

Genetically encoded photosensitizers have excellent specificity to target molecule of interest. Since colour variants of genetically encoded photosensitizer are activated by different excitation wavelengths, utilizing those would enable several different protein/cells to be inactivated at a defined time and area in intact systems. In order to achieve this, a green colour variant of currently available photosensitizing protein, SuperNova Red, is developed in this study and named SuperNova Green. *In vitro* characterization has shown that SuperNova Green emits green emission when excited with blue light. SuperNova Green is monomeric and shows its superiority over dimeric photosensitizing proteins when fused with target protein or localization signal.

Chapter 2: Photosensitization property of SuperNova Green

As known that different type of ROS generated by photosensitizer would have different target, specificity and diffusion range, it is important to know which type of ROS does SuperNova Green produce. Based on characterization result, SuperNova Green produces superoxide and its derivatives (hydrogen peroxide and hydroxyl radical). Since superoxide and its derivatives have essential role in controlling intracellular events, SuperNova Green will also be useful to manipulate cell behavior or elucidate ROS function in intracellular events.

Chapter 3: Selective protein inactivation and cell ablation

This chapter describes the usefulness of SuperNova Green to inactivate protein and promote cell ablation. As proof of concept of multiple protein inactivation and cell ablation, SuperNova Green in combination with SuperNova Red could selectively inactivate Pleckstrin Homology domain of Phospholipase C-δ1 and ablate cancer cells through selective light irradiation with blue and orange light respective for SuperNova Green and SuperNova Red activation.

Chapter 4: Concluding remarks

As the conclusion, SuperNova Green as a green monomeric photosensitizing protein has brought new insight and new advancement to the optogenetic toolbox. As a perspective, SuperNova Green will be capable to meet the cutting-edge imaging technique, such as super-resolution imaging, to achieve a better understanding of biological phenomena.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　Yemima Dani Riani　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	永井　健治
	副 査	教授	渡邊　肇
	副 査	教授	内山　進

論文審査の結果の要旨

本論文は、光増感赤色蛍光タンパク質をアミノ酸変異導入により改変し緑色変異体を開発した論文である。光増感蛍光タンパク質は光照射により活性酸素種を産生するため、時空間的に制御されたタンパク質の不活性化や細胞剥離を起こすための有用なツールである。これらの操作を通してタンパク質機能、細胞内シグナル伝達経路、細胞間相互作用を解明する手がかりを得ることができる。光増感物質からの活性酸素の産生は特定の励起波長で起こるため、異なる色の光増感タンパク質を用いることにより複数の不活性化を時空間制御することができる。本論文では、光増感赤色蛍光タンパク質 SuperNova と新たに開発した光増感緑色蛍光タンパク質 SuperNova Green を用いてそれを達成した。

第一章では、合理的なタンパク質のデザインと部位特異的変異導入に基づく SuperNova Green の開発に関して記述されている。*In vitro* での解析により SuperNova Green は青色光照射により緑色の蛍光を発することがわかった。また、SuperNova Green は単量体として存在し、ターゲットタンパク質や局在化シグナル配列との融合に悪影響を及ぼさないことで二量体を形成する光増感タンパク質に対する優位性を示している。

第二章では、SuperNova Green が産生する活性酸素種に関して記述されている。活性酸素指示薬や抗酸化物質を用いた特性評価に基づき、SuperNova Green はスーパーオキシドアニオンラジカルとその派生体（過酸化水素、ヒドロキシラジカル）を主に産生することを明らかにした。スーパーオキシドアニオンラジカルとその派生体は細胞内で起こる生理機能に欠かせないものであるため、SuperNova Green は細胞動態の操作や細胞内で起こるイベントにどのように ROS が機能しているのかを解明することにも有用であることが示された。

第三章では、SuperNova Green のタンパク質不活性化、細胞剥離に関する有用性を記述した。複数種のタンパク質の機能破壊や細胞剥離の概念実証のために、Phospholipase C-δ1 の Pleckstrin Homology ドメインを SuperNova と SuperNova Green の組み合わせにより選択的に破壊できることを示し、さらに、ミトコンドリアに SuperNova もしくは SuperNova Green を局在化させたがん細胞に関して橙色光、青色光特異的にそれぞれを発現する細胞を剥離させることに成功した。

SuperNova Green は単量体型の光増感蛍光タンパク質として、光遺伝学ツールに新たな価値をもたらした。今後の展望としては、超解像イメージング技術のような最先端イメージング技術と融合することにより生理機能のより深い理解をもたらすことが期待される。

これらの理由により、本論文を博士論文として価値あるものと認める。