



Title	Rationally Designed Chemical Probes for Live-Cell Fluorogenic Protein Labeling
Author(s)	高, 靖馳
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76507
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、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

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名 (高 靖 馳)	
論文題名	Rationally Designed Chemical Probes for Live-Cell Fluorogenic Protein Labeling (生細胞内タンパク質を可視化する化学プローブの合理的設計)
論文内容の要旨 タンパク質の蛍光ラベル化技術は、生きた細胞におけるタンパク質の時空間解析を可能にし、生命科学分野において非常に有力な研究手法である。近年、このようなラベル化技術として、標的タンパク質とタグタンパク質との融合タンパク質を細胞に発現させ、合成プローブを添加してタグタンパク質をラベル化する手法が報告されている。この手法の利点として、プローブの添加によりタンパク質ラベル化の制御が可能であること、また、様々な性質を有する色素や機能性分子をプローブに組み込めることが挙げられる。特に、遊離状態では非蛍光性で、タグタンパク質をラベル化して初めて蛍光を発する発蛍光プローブを用いれば、未反応のプローブからシグナルが観測されないため、その除去操作が不要であり、簡便な操作で細胞内のタンパク質を可視化できる。 これまでに多くの発蛍光プローブが報告されている。しかしながら、既存のプローブの問題点として、低いラベル化反応速度や低いイメージングコントラストなどが挙げられる。また、多くのプローブは複雑な構造を有し、その結果、煩雑な合成経路が必要である。さらに、プローブの分子量が増大するため、水溶性や細胞膜透過性の低下などの悪影響が懸念される。 当研究室ではphotoactive yellow protein (PYP) をタグタンパク質として利用するタンパク質ラベル化技術の開発を行ってきた。PYPタグの分子量は蛍光タンパク質の約半分の14 kDaであり、そのサイズの小ささから標的タンパク質の挙動への影響が抑えられる。本博士論文では、PYPタグをラベル化する発蛍光プローブの合理的設計を行い、さらに、タンパク質工学手法と組み合わせ、生細胞内のタンパク質を迅速に、高コントラストで可視化できる手法を確立した。 本博士論文は4章から構成されている。 第1章では、クマリン蛍光団の設計に基づいたタンパク質ラベル化プローブの開発について述べる。クマリン蛍光団の蛍光メカニズムとタンパク質・リガンド相互作用に着目し、新たなタンパク質ラベル化プローブを開発した。新規プローブは従来のクマリン色素と比較して波長が大きく長波長側にシフトし、また、生細胞内のタンパク質をわずかな数分以内に高いコントラストで可視化できる。開発したプローブを応用して、ミトコンドリアにあるタンパク質脱アセチル化酵素Sirtuin 3 (SIRT3) の局在について調べ、SIRT3の細胞核への局在をはじめて生きた細胞で捉えた。 第2章では、蛍光プローブとタグタンパク質の静電相互作用に着目したタグタンパク質の改変について述べる。負電荷を持つプローブによるラベル化反応速度を向上させるために、タグタンパク質の負電荷を持つアミノ酸を、電荷を持たないアミノ酸に変異した。改変したタグタンパク質は、負電荷を持つプローブによるラベル化性能を大きく向上させた。さらに、本技術を応用して、膜タンパク質の局在・動態の可視化を行った。 第3章では、第1章で開発したプローブの蛍光の環境応答性を利用し、タンパク質分解の生細胞イメージングに応用した。プローブは、タグタンパク質の疎水性ポケットに局在する時にのみ蛍光を示すため、標的タンパク質とタグタンパク質の融合タンパク質が分解されるに伴い疎水性ポケットが消失し、プローブの蛍光が抑制される。この蛍光の減少をタンパク質分解のリアルタイム追跡に利用した。また、長時間にわたるタンパク質の観察を可能にするため、タンパク質工学により、プローブと安定な複合体を形成するタグタンパク質変異体を開発した。本技術を応用して、免疫制御を担うRegnase-1の免疫刺激に応答する分解の生細胞イメージングを行った。 第4章では、合理的設計による新たなタンパク質ラベル化プローブの開発について述べる。クマリン蛍光団の分光学的性質に着目し、プローブの波長、明るさを向上させた蛍光リガンドを開発した。また、プローブに、タグタンパク質と反応する新しい反応基を組み込み、細胞内のタンパク質を迅速且つ特異的にラベル化でき、長時間の生細胞イメージングを可能にしたプローブを開発した。さらに、開発したプローブの細胞膜透過性が非常に高く、細胞膜表面のタンパク質をラベル化しないことを利用し、細胞内に移行した膜タンパク質の選択的な可視化に成功した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (高 靖 馳)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	菊地 和也
	副 査	教授	中山 健一
	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	坂本 一之

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、小分子蛍光プローブを用いるタンパク質ラベル化技術の開発と応用について述べている。近年、生きた細胞においてタンパク質を可視化する技術として、標的タンパク質とタグタンパク質との融合タンパク質を細胞に発現させ、小分子蛍光プローブを用いてタグタンパク質をラベル化する技術が注目を集めている。特に、タグタンパク質と未反応の時に蛍光を示さず、タグタンパク質をラベル化して初めて蛍光を発する発蛍光プローブを用いれば、未反応のプローブからのバックグラウンドシグナルが観測されないため、その除去操作が不要であり、簡便な操作で細胞内のタンパク質を可視化できる。これまでに多くの発蛍光プローブが報告されている。しかしながら、既存のプローブの多くは、細胞膜非透過性、低いラベル化反応速度や低いイメージングコントラストといった問題点により実用性に欠けている。そこで本論文は、既存のプローブの問題点を克服するため、photoactive yellow protein タグ (PYP タグ) をラベル化する新たな発蛍光プローブの開発に取り組んでいる。本博士論文は序章、第 1 章、第 2 章、第 3 章、第 4 章、結論と展望から構成され、以下に本論文の成果を要約する。

第 1 章では、新たなクマリン蛍光団を設計し、新規クマリン蛍光団を PYP タグのリガンドとして利用するプローブの開発について述べている。クマリン蛍光団の蛍光メカニズムとタンパク質ーリガンド相互作用に着目し、新たなタンパク質ラベル化プローブを開発している。新規プローブは既存のクマリンプローブと比較して波長が長波長側にシフトし、蛍光顕微鏡に広く用いられるフィルタによる検出に適した波長を有する。また、新規プローブの PYP タグラベル化反応速度も大きく向上し、生細胞内のタンパク質をわずか数分以内に高いコントラストで可視化できる。開発したプローブを応用して、ミトコンドリアにあるタンパク質脱アセチル化酵素 sirtuin 3 (SIRT3) の局在について調べ、生きた細胞 SIRT3 の細胞核への局在の可視化に成功している。

第 2 章では、PYP タグの表面電荷を改変することで、第一章で開発した負電荷を持つプローブのラベル化反応速度の向上について述べている。負電荷を持つプローブによるラベル化反応速度を向上させるために、PYP タグの表面に存在する負電荷を持つアミノ酸を、電荷を持たないアミノ酸に変異した PYP タグ変異体を開発している。得られた PYP タグ変異体は、負電荷を持つプローブによるラベル化性能を大きく向上させている。さらに、本技術を膜タンパク質の局在・動態の可視化に応用し、細胞内にある glucose transporter 4 (GLUT4) の、インスリンに刺激に応答する細胞膜への移行の可視化に成功している。

第 3 章では、第 1 章で開発したプローブを利用した、タンパク質分解の生細胞イメージングについて述べている。第 1 章で開発したプローブは、PYP タグの疎水性ポケットに局在する時のみ蛍光を示すため、標的タンパク質と PYP タグの融合タンパク質が分解されるに伴い PYP タグの疎水性ポケットが消失し、プローブの蛍光が抑制される。この蛍光の減少を利用し、タンパク質分解のリアルタイム追跡に成功している。また、長時間にわたるタンパク質分解の

観察を可能にするため、PYP タグを改変し、プローブと水素結合を形成し、安定な複合体を形成する PYP タグ変異体を開発している。プローブと PYP タグ変異体を応用して、免疫制御を担う Regnase-1 の免疫刺激に応答する分解の生細胞イメージングに成功している。

第 4 章では、蛍光の明るさとラベル化の安定性を向上させた新たなタンパク質ラベル化プローブの開発について述べている。PYP タグとの反応基として、これまでの PYP タグラベル化プローブが持つチオエステル代わりに、 α -クロロアセチル基を使用し、さらに、クマリン蛍光団の分光学的性質に着目し、プローブの波長、明るさを向上させた蛍光リガンドを開発している。新規プローブは、細胞内のタンパク質を迅速且つ特異的にラベル化でき、さらに長時間の生細胞イメージングを可能にしている。また、開発したプローブの細胞膜透過性が非常に高く、細胞膜表面のタンパク質をラベル化せず、細胞内のタンパク質のみをラベル化する性質を有する。この性質を利用し、細胞内に移行した膜タンパク質の選択的な可視化に成功している。

以上のように、本論文は小分子プローブの性質、またプローブとタグタンパク質の反応速度と結合の安定性に着目し、化学プローブの合理的設計とタンパク質工学手法を組み合わせることにより、細胞内のタンパク質を迅速に、高コントラストで可視化する手法の開発に成功している。さらに、確立した手法を応用し、生細胞におけるタンパク質の局在と動態の可視化に成功している。本論文で開発した、優れた蛍光の明るさとタグタンパク質への結合の安定性を有するプローブは、細胞内のタンパク質を可視化する非常に有力なツールと言え、生命科学研究への貢献が期待される。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。