

論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 14 号	氏 名	傳田 将也
学位論文題目	Development of novel protein labeling reagents utilizing <i>N</i> -sulfanylethylanilide unit (<i>N</i> -sulfanylethylanilide (SEAlide) を利用した新規タンパク質ラベル化試薬の開発研究)		
<p>タンパク質は、生命現象を司る物質であり、細胞の機能維持に重要な役割を担っている。これらタンパク質に関する機能解明研究は進んでいるものの、未だその機能が明らかにされていないものも多く存在する。そのため、細胞内でのタンパク質の機能解明は、更なる生命現象の理解に重要だと考えられる。タンパク質の機能解明に汎用される手法の一つとして、機能未知タンパク質（標的タンパク質）選択的に蛍光色素などのレポーター分子でラベル化し、このレポーター分子の動的挙動を手掛かりとする手法がある。本法の利用には、細胞内での標的タンパク質選択的なラベル化が必要であり、現在、アフィニティーラベル化法が最も汎用されている。本ラベル化法では、標的タンパク質と選択的に相互作用する「リガンド部位」と蛍光色素などの「レポーター部位」、およびタンパク質と共有結合を形成する「反応部位」を有するラベル化試薬を利用する。これまでに報告されたラベル化試薬は、弱いながらも常時活性化された反応部位を有している。このため標的以外の求核種とも反応することが懸念される。そこで著者は、自身が所属する研究室で独自に開発した「SEAlide」をラベル化試薬反応部位として利用することで、標的以外との反応が抑制可能では無いかと考えた。SEAlide は求核攻撃に対して不活性なアミド型であり、リン酸塩の添加をトリガーとして活性を有するチオエステル型へ変換する。本反応においてリン酸塩は酸塩基触媒として機能し、SEAlide の N-S アシル基転移反応を促進しているものと考察している。さて、タンパク質表面には、カルボキシル基やアミノ基などの多数の酸性、塩基性官能基が存在する。このことからタンパク質もリン酸塩同様、酸塩基触媒として機能すると考え、SEAlide を導入したラベル化試薬「SEAL-tag」の開発に着手した。すなわちリガンドを介して SEAL-tag を対応する標的タンパク質表面に固定化する。これにより、SEAlide の N-S アシル基転移反応は当該タンパク質により促進され、結果として生成したチオエステルに対して標的タンパク質中の求核性官能基が攻撃することで標的選択的なラベル化が起こる設計である。</p> <p>本研究において著者は、標的モデルタンパク質として human carbonic anhydrase (hCA) および cyclooxygenase 1 (COX-1) を用いることとした。そこで benzenesulfonamide (for hCA) および indomethacin (for COX-1) をリガンド部位に導入することとし、SEAlide を用いてレポーター分子と連結した。合成した SEAL-tag を用いて初めに hCA のラベル化を検討した。hCA を有する赤血球細胞と SEAL-tag を緩衝液中インキュベートした結果、内在性 hCA の選択的なラベル化が可能であることが明らかになった。さらに精製 hCA1 をラベル化後、nanoLC-MS/MS 解析を行いラベル化部位の同定を行った。この結果、137 番目の Lys 選択的にラベル化されることを確認した。続いて 3 タンパク質混合物中の COX-1 のラベル化に取り組み、COX-1 選択的ラベル化を確認した。本結果より SEAL-tag は、導入するリガンドの変更により対応するタンパク質のラベル化へ適応可能であることを示した。</p> <p>著者は、hCA および COX-1 ラベル化実験の結果より SEAL-tag が有する「標的タンパク質選択的ラベル化能」に関する知見を得ることに成功した。今後、本ラベル化試薬がタンパク質機能解明研究の基盤となるアフィニティーラベル化試薬の新たな選択肢の一つになるものと確信している。</p>			