

論 文 内 容 要 旨

報 告 番 号	甲 創 第 79 号	氏 名	宮 島 凜
学位論文題目	Studies on target protein identification of CXCL14 enabled by chemically synthesized proteins (合成 CXCL14 ケモカイン誘導体を利用した標的タンパク質同定研究)		
<p>【背景】</p> <p>タンパク質は生体機能の根幹を担っており、その機能の分子レベルでの解析は生命現象の解明や新規創薬標的の創出に大いに貢献する。我々の研究グループは、機能未知のケモカイン CXCL14 に着目し、本タンパク質が非メチル化 CpG DNA と結合し、CpG DNA を細胞内エンドソーム/リソソーム中の Toll-like receptor 9 に送達することで、自然免疫反応を活性化することを見出した。しかしながら、本免疫反応の活性化の第一ステップである CXCL14-CpG DNA 複合体の取り込みに関与する細胞膜受容体は明らかになっていない。そこでタンパク質化学合成を基盤として、CXCL14 の自然免疫活性化機構の詳細に迫るべく研究を開始した。</p> <p>【方法・結果】</p> <p>まず、CXCL14 の標的受容体の同定にあたり、CXCL14 の分子プローブ合成が必要となった。タンパク質の化学合成では、ペプチドチオエステルと N 末端システイン含有ペプチド間の化学選択的縮合反応である Native Chemical Ligation (NCL)法が汎用される。このようにペプチドチオエステルはタンパク質化学合成における必須の合成中間体であり、その実用的な調製法の開発が求められている。そこで著者は、天然アミノ酸配列からのチオエステル合成法の確立を目指し、S-シアノシステイン含有ペプチドのアンモニア水処理によるアミド結合切断反応に着目した。本反応によって、S-シアノシステイン含有ペプチドからペプチドアミドを得ることが可能である。著者は本反応に用いる求核剤をヒドラジンに置き換えることで、S-シアノペプチドを対応するペプチドヒドラジドへと変換可能であることを見出した。ペプチドヒドラジドは既報に従いアシルアジド経由でペプチドチオエステルへと誘導可能である。さらに著者は、ジンクフィンガー配列を利用することで、位置選択的なシステイン残基側鎖シアノ化を行い、続くヒドラジド化およびチオエステル化を経てシステイン含有ペプチドチオエステルを天然アミノ酸配列から得ることに成功した。本反応の利用により、サソリ毒 TsTxV および CXCL14 のチオエステルフラグメントを合成し、これらを TsTxV および CXCL14 の全合成に応用した。</p> <p>続いて、確立した CXCL14 合成法を基盤として CXCL14 の分子プローブ合成に着手した。標的未知リガンドの標的タンパク質同定ツールとして、光反応性プローブが挙げられる。光反応性プローブによって標識されたタンパク質をプロテオミクス解析に付すことで、標的タンパク質の同定が可能である。著者は、CXCL14 の構造活性相関を基に、C 末端を位置選択的に修飾した CXCL14 の光反応性プローブを完全化学合成した。本プローブをマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いた細胞ラベル化実験に適用し、標識されたタンパク質のプロテオミクス解析を行った。解析の結果、Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)を CXCL14 の新たな標的膜受容体として見出した。CXCL14 が介在する CpG DNA のエンドソーム/リソソーム移行促進メカニズムの詳細は依然不明であるが、種々検証実験の結果、CXCL14 受容体として見出した LRP1 は CXCL14-CpG DNA 複合体のエンドソーム/リソソーム移行の負の制御因子であることを明らかにした。</p>			