

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	光触媒近傍で起こるラジカルのタンパク質ラベル化法を活用した生体分子間相互作用解析法の開発
Title(English)	
著者(和文)	對馬理彦
Author(English)	Michihiko Tsushima
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11984号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 浩之,湯浅 英哉,上田 宏,小倉 俊一郎,林 智広,岡田 智
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11984号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	對馬 理彦		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	中村 浩之	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	岡田 智	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「光触媒近傍で起こるラジカルタンパク質ラベル化法を活用した生体分子間相互作用解析法の開発」と題し、光触媒から半径数ナノメートルの局所空間で起こるラジカル反応を活用したタンパク質のラベル化法を基盤とし、リガンド-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用といった生体分子間相互作用解析法の開発について述べたものであり、全6章より構成されている。

第一章「序論」では、低分子-タンパク質相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用の解析手法について述べた。低分子-タンパク質相互作用は相互作用の弱いものを高感度に検出できる手法は少ないこと、タンパク質-タンパク質相互作用は細胞内の解析対象に対して、迅速にかつ細胞への損傷なく、弱い一過性の相互作用を検出する方法がないことを述べ、本研究の意義を明らかとした。

第二章「リガンド結合タンパク質の精製とラベル化を同時に可能とする光触媒担持アフィニティービーズの開発」では、アフィニティービーズ上での標的タンパク質のラベル化を達成するために、**Ru(bpy)₃** 光触媒をアフィニティービーズ上に担持したが、**Ru** のもつ 2+ の正電荷に由来する非特異的なタンパク質の吸着を生じた。配位子構造にカルボキシル基を導入した **Ru/dcbpy** 光触媒では、カルボキシラートが **Ru** のもつ電荷を中和することによって非特異的なタンパク質の吸着を抑制し、標的タンパク質を選択的に精製・ラベル化することが可能となった。**Ru/dcbpy** 光触媒担持アフィニティービーズを用い、細胞破碎液中の標的タンパク質の精製・ラベル化によって、従来法の銀染色では検出できないほど微量なタンパク質を検出可能にした。

第三章「ラジカル近接ラベル化剤 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) の開発」では、**Ru/dcbpy** 光触媒担持アフィニティービーズ上でタンパク質混在系中のリガンド結合タンパク質選択的なラベル化反応を検討した。従来までのラベル化剤 TRT では非特異的なラベル化反応が多く進行した。ラベル化剤のスクリーニングを行ったところ、短寿命なラジカル活性種を生じるため、**Ru** 光触媒の半径数 nm 以内でラベル化が可能な 1-methyl-4-arylurazole を見出した。MAUra を用いた **Ru** 光触媒担持アフィニティービーズ上でのラベル化によってリガンド結合タンパク質の高い効率で選択的にラベル化することに成功した。

第四章「弱いリガンド-タンパク質相互作用を解析可能にする光触媒担持アフィニティービーズ上での近接ラベル化法の開発」では、第二章で開発した **Ru/dcbpy** 光触媒担持アフィニティービーズおよび第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を駆使し、リガンドとの相互作用が弱いタンパク質であるレクチンのラベル化・同定を行った。従来法では検出が困難である細胞内在性レクチンのラベル化・nanoLC-MS/MS による解析を行ったところ、細胞に内在する微量のリガンド結合タンパク質を網羅的にラベル化することに成功した。リガンド結合タンパク質のみならず、リガンド結合タンパク質への相互作用タンパク質もラベル化することに成功した。

第五章「生細胞内での光触媒近接ラベル化を活用したタンパク質-タンパク質相互作用解析法の開発」では、第三章で開発した近接ラベル化剤 MAUra を用い、解析対象タンパク質 (POI) の相互作用タンパク質の選択的なラベル化を志向し、細胞内光触媒近接ラベル化法 iPPL を確立した。iPPL に最適な細胞膜透過性の高い有機光触媒を、光触媒担持アフィニティービーズ上でのリガンド結合タンパク質ラベル化および細胞膜上の HaloTag-POI に対する光触媒近接ラベル化によりスクリーニングしたところ、acriflavine 光触媒を細胞内でのラベル化に最適な光触媒として見出した。Acriflavine 光触媒を用い、10 nm 程度の直径のタンパク質含有複合体 nucleosome に対して iPPL 法を適用した。従来法 (BioID 法、APEX 法) では POI との相互作用タンパク質のみならず POI から離れた距離にあるタンパク質もラベル化する。一方、iPPL 法は POI の関連タンパク質や H2B と非常に近い距離に存在するタンパク質を選択的にラベル化できることが明らかとなった。

第六章「結論」では、本論文を総括した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of Graduate major in	生命理工学 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	對馬 理彦		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	中村 浩之	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	岡田 智	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This thesis described the development of methodology for analyzing biomolecules interactions such as ligand-protein interaction and protein-protein interaction utilizing single electron-transfer mediated radical reaction which proceeded in close proximity to photocatalyst.

In chapter 1 “introduction”, methods for analyzing ligand-protein interactions and protein-protein interactions were described. It is difficult to identify weak molecular interactions and trace amount of target, so technologies for identification of such interactions.

In chapter 2 “Development of ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads which enables selective purification and chemical labeling of ligand-binding proteins”, detection of trace amount of proteins was achieved utilizing labeling on ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads.

In chapter 3 “Development of 1-methyl-4-arylurazole (MAUra) as a proximity labeling reagent”, MAUra was discovered as a labeling reagent which enables selective labeling only in close proximity to photocatalyst. It was showed that labeling on ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads using MAUra can label ligand-binding proteins with high selectivity.

In chapter 4 “Development of proximity labeling on ruthenium photocatalyst-functionalized affinity beads which enables analyzing proteins which have weak affinity to its ligand”, detection and identification of carbohydrate-binding proteins which weakly interact with carbohydrate ($K_d > 10^{-4}$ M). It was showed that not only weak ligand-protein interaction but also protein-protein interaction in cell lysate.

In chapter 5 “Development of intracellular photocatalytic proximity labeling for profiling protein-protein interaction”, proximity labeling technology using organic photocatalyst and MAUra in living cells for profiling protein-protein interaction was developed. Acriflavine was found to be an efficient cell-membrane-permeable photocatalyst. It was revealed that intracellular photocatalytic proximity labeling (iPPL) has smaller labeling radius (~6 nm) than BioID (~10 nm), and it was enabled focused PPI profiling.

In chapter 6 “conclusion”, the results in this thesis were summarized.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).