



Title	低分子生理活性化合物の新規な標的タンパク質同定法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	穴吹, 友亮
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13916号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/77833
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Tomoaki_anabuki_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（農学）

氏名 穴吹 友亮

学位論文題名

低分子生理活性化合物の新規な標的タンパク質同定法の開発

【背景】

光アフィニティーラベル化法は、低分子生理活性化合物の標的タンパク質を同定する手法として有用性が高い。しかし、本手法では生理活性化合物に嵩高い化合物である光反応基を導入する必要があるため、これにより標的タンパク質との相互作用が損なわれる場合があるという問題点があった。また、光反応基によるクロスリンク反応の収率は数%以下であり、検出感度が低いことも指摘されてきた。そこで、本研究では、これらの問題点を克服する新規な標的タンパク質同定法の開発を目指した。

1. アジドプローブとクリック反応を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発

既存の手法が抱える「標的タンパク質との相互作用の損失」という問題を解決するため、アジド基のみを導入した生理活性化合物（アジドプローブ）を標的タンパク質と相互作用させた後に、クリック反応により光反応基を導入するという標的タンパク質検出法の開発を行った。開発した標的タンパク質検出法の有効性を確認するため、ジャスモン酸合成経路中の酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ（PpAOS1）と既知のAOS阻害剤を対象としたモデル実験を行った。PpAOS1阻害剤由来のアジドプローブと、ベンゾフェノンをも有するリンカーを用いて、組換えPpAOS1を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液からPpAOS1の検出を行った。その結果、PpAOS1に由来する化学発光シグナルが確認されたため、本検出法を用いて特異的に標的タンパク質を検出できることが示された。

2. タンパク質架橋剤BS3を用いる新規な標的タンパク質検出法の開発

既存の手法が抱える「検出感度の低さ」という問題を解決するため、光反応基の役割をアミノ基と特異的に反応するタンパク質架橋剤、bis(sulfosuccinimidyl)suberate, disodium salt (BS3) に代替させた新規な標的タンパク質検出法を開発した。タンパク質架橋剤BS3は、*N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端に有しており、アミノ基に対して選択的に結合する。新規検出法では、アジドプローブを標的タンパク質と相互作用させた後、タンパク質架橋剤BS3によりタンパク質とアジドプローブをクロスリンクさせることで標的タンパク質をアフィニティーラベル化する。BS3は高い反応性を有しているため、新規検出法の検出感度の高さを期待した。新規検出法の有効性を確認するため、アブシジン酸(ABA)とその受容体であるAtPYL2の相互作用を対象としたモデル実験を行った。ABA由来のアジドプローブを用いて、組換えAtPYL2を生産する大腸菌のタンパク質粗抽出液

からの AtPYL2 の検出を行った。その結果、AtPYL2 に由来する化学発光シグナルが確認されたため、本手法を用いて特異的に標的タンパク質を検出できることが確認された。また、前述の光反応基を用いる新規な標的タンパク質検出法との比較実験により、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法の方が高感度であることが示された。

3. タンパク質架橋剤 DTSSP を用いる新規な標的タンパク質同定法の開発

生理活性化合物の標的タンパク質を同定するためには、その分子量を明らかにするだけでなく、標的タンパク質を精製し、質量分析によりアミノ酸配列を解析する必要がある。新規同定法では、前述のタンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を基礎とし、アジドプローブおよびアミノ基を有するリンカーを用いてビオチン（検出用官能基）を標的タンパク質に導入する。一方で、タンパク質架橋剤として BS3 の代わりに分子内ジスルフィド結合を有する dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), disodium salt (DTSSP) を用いることとした。ジスルフィド結合は DTT などの還元剤により切断可能であるため、アフィニティークロマトグラフィーによる標的タンパク質の精製において還元剤を用いた特異的な溶出が期待された。本同定法の有効性を確認するため、ABA 由来のアジドプローブを用いて、組換え AtPYL2 を発現した大腸菌のタンパク質粗抽出液から AtPYL2 の精製を行った。DTT を含むバッファーによる溶出画分をトリプシン消化後、nano LC-MS/MS によりペプチド断片のアミノ酸配列を解析した。その結果、AtPYL2 由来のペプチドが検出されたため、本同定法を用いて標的タンパク質を同定できることが示された。

4. シロイヌナズナの未報告のアブシジン酸結合タンパク質の同定

前述の標的タンパク質同定法によりシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のタンパク質粗抽出液を用いて ABA 結合タンパク質の精製を行った結果、未報告の ABA 結合タンパク質の存在が示唆された。そこで、溶出画分の電気泳動後のゲルから本タンパク質のバンドを切り出し、トリプシン消化を行った後、ペプチド断片の解析を行った。その結果、Thioredoxin h3 (AtTRXh3) (AT5G42980) 由来の 2 種類のペプチドが検出された。ABA と AtTRXh3 の相互作用について詳細に調べるため、大腸菌を用いて組換え AtTRXh3 の作製を行った。次に、タンパク質架橋剤 BS3 を用いる新規な標的タンパク質検出法を用いて、組換え AtTRXh3 の検出を行った。その結果、ウェスタンブロットティングにおいて AtTRXh3 に由来する化学発光シグナルが観察されたため、ABA と組換え AtTRXh3 が結合することが示された。

以上、本研究では、生理活性化合物の新規な標的タンパク質検出法および同定法を考案し、標的タンパク質と生理活性化合物の既知の相互作用を対象としたモデル実験によりその有効性を確認した。さらに、未報告の ABA 結合タンパク質を同定し、考案した新規手法の有効性をさらに証明した。従って、本研究で考案した新規手法が未知の標的タンパク質同定に応用可能であることが証明できた。