HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13916号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77833
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoaki_anabuki_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博　士（農学）　氏名　穴吹　友亮

審査担当者　主　査　准教授　福士　幸治
副　査　教　授　松浦　英幸
副　査　教　授　森　春英
副　査　准教授　橋本　誠
副　査　教　授　高橋　公咲（東京農業大学）

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

本論文は、和文 96 頁、図 42、表 2 からなり、参考文献 3 編が添えられている。 生理活性化合物は、受容体や酵素等のタンパク質に作用することで生理作用を示す。従って、上述の標的タンパク質の同定は、生理活性化合物の作用機序を解明する上で極めて重要である。標的タンパク質の同定法として最も多くの成功例が報告されているのが光アフィニティーラベル化法である。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り、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、光反応基によるプローブと標的タンパク質のクロスリンク反応が低収率であり、検出感度が低いことも問題であった。そこで、本研究は、前述の光アフィニティーラベル化法の欠点を克服した新規な標的タンパク質同定法の開発を目的に行われた。

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設計した。PpAOS1 を用いたモデル実験により新規検出法の有効性を証明した。

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、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 により標的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。AtPYL2 を用いたモデル実験により新規検出法の有効性を証明した。また、新規検出法は、前章の標的タンパク質検出法より高効率で標的タンパク質を検出できることが示された。

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、標的タンパク質を精製し、ペプチドマスフィンガープリンティングによる同定が必須である。前項のタンパク質架橋剤 BS3 を用いた新規な標的タンパク質検出法をベースとした標的タンパク質同定法の開発を試みた。本実験ではタンパク質架橋剤として、上述の 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。AtPYL2 を用いたモデル実験により BS3 を用いた新規同定法の有効性を証明した。

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

前項の標的タンパク質同定法を用いてシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）のタンパク質粗抽出液からアブシジン酸（ABA）結合タンパク質の精製を行った。その結果、未報告の ABA 結合タンパク質が精製された。ペプチドマスフィンガープリンティングにより本タンパク質を AtTRXh3 (AT5G42980)と同定した。同定された。ABA と組換え AtTRXh3 の相互作用を詳細に検討したところ、ABA と組換え AtTRXh3 が結合することが示された。

以上の研究成果から、既存の光アフィニティーラベル化法よりも高効率で生理活性化合物の標的タンパク質を検出できる手法が確立された。また、本検出法を応用した標的タンパク質の同定法も開発した。本博士論文の成果は、化学生物学の分野の発展に十分貢献しうる成果である。よって、審査員一同は、穴吹友亮君が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。