

# 論文審査の結果の要旨

氏名 中西 淳

本論文は4章より成る。第1章は序論であり、本研究の動機と目的が述べられている。まず、細胞情報伝達に関わる蛋白質の構造変化の生きた細胞内での蛍光可視化は、細胞の分子機構を理解する上で重要であることを述べている。そのための方法の一つとして、蛋白質分子内のミクロな環境の疎水性変化に応じて蛍光波長や量子効率が大きく変化する分子が、環境感受性プローブとして用いられたことを説明している。そのプローブ分子が従来細胞内に多数存在するシステイン残基のチオール基に反応性があるため蛋白質の特定の位置に一つの分子を導入するのが困難であった。そのことを踏まえ、細胞内で蛋白質の特定部位に標識可能な新規環境感受性蛍光プローブを設計・合成し、このプローブを用いて生細胞内で蛋白質構造変化の蛍光可視化・検出を目的とすることが述べられている。

第2章は本論である。上記目的のために R. Y. Tsien らが開発した細胞内での蛋白質の蛍光標識法を利用し、nile red 類縁体の蛍光団に直接2つのヒ素原子を導入した新規環境感受性蛍光プローブ分子 (Bisarsenical nile red analogue bis-EDT adduct, BArNile-EDT<sub>2</sub>) を合成している。この分子は、ヒ素原子を介して遺伝子工学的に導入した $\alpha$ ヘリックス中の  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+4$ ,  $i+5$  番目の4つのシステイン (4Cys-motif) に特異的に結合する。この分子が、実際に機能することを検証するため、本プローブ分子を標識する蛋白質として、水溶液中でもヘリックス構造をとり、且つ4Cys-motifを含む17残基のペプチド (AEAAAREACCRECCARA) を、Ca<sup>2+</sup>結合蛋白質カルモデュリン (CaM) のC末端に連結させた CaM-helix を遺伝子工学的に合成した。

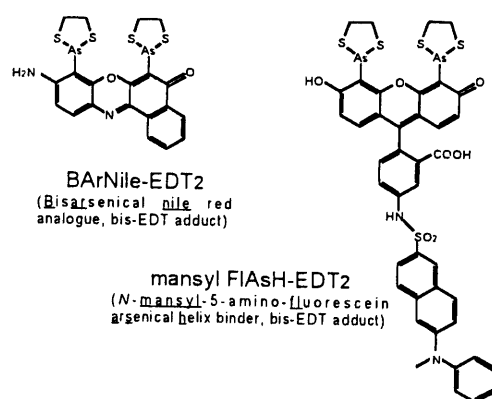
細胞外において、BArNile は4Cys-motif に特異的に結合すること、そして非蛍光性であった BArNile-EDT<sub>2</sub> が4Cys-motif への結合に伴い蛍光強度を増大させることを、逆相 HPLC の保持時間の変化及び蛍光光度計による蛍光測定により示している。また、この時 CaM-helix に結合した BArNile は Ca<sup>2+</sup>濃度依存的に蛍光スペクトルを変化させることを示している。この BArNile-EDT<sub>2</sub> が細胞内でも CaM-helix の4Cys-motif を特異的に蛍光標識することを示すために、CaM-helix のC末に緑色蛋白質 (GFP) の黄色変異体である YFP を連結させた CaM-helix-YFP をヒト胎児腎臓細胞株の HEK293 細胞に発現させて蛍光標識を試み、YFP と BArNile 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化を指標にして、BArNile が細胞内においても特異的4Cys-motif を標識可能であることを実証している。

更に、細胞内で蛍光標識した CaM-helix は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させる刺激によって、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に依存して蛍光強度が変化することを観察している。この蛍光強度の時間変化は、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示薬 Fura 2 による蛍光強度の時間変化とよい一致をしたことから、生きた細胞内での CaM の構造変化であると結論している。このプローブ分子は蛋白質の特定のヘリックスに標識可能であるため、X 線結晶構造解析などの構造的知見に基づいて合理的に 4Cys-motif を導入することで、細胞内情報伝達に関わる蛋白質一般に適応可能であると期待される。

第 3 章では、二つ目の環境感受性プローブとして、mansyl FAsH-EDT<sub>2</sub> (*N*-mansyl-5-amino-fluorescein arsenical helix binder, bis-EDT adduct) を合成したことについて述べている。細胞外において mansyl FAsH-EDT<sub>2</sub> で蛍光標識した CaM-helix は BArNile-EDT<sub>2</sub> で標識した場合よりも高感度に構造変化を検出している。このプローブ分子は膜透過性が低いために、プローブの細胞外投与による細胞内標的蛋白質の蛍光標識はできず、マイクロインジェクションによる細胞内導入ないし膜透過性を増大させた誘導体の合成によってこの点が克服されると述べている。第 4 章では総合的結論が述べられている。

以上、本研究は、生きた細胞内で蛋白質の特定部位を標識可能な環境感受性蛍光プローブ分子を初めて合成し、それを用いての生きた細胞内での蛋白質構造変化の可視化・検出法の開発に関するもので、理学の発展に寄与する成果を収めた。よって博士取得を目的とする研究として充分であると審査員は全員一致で認めた。なお、本論文は各章の研究が複数の研究者との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行ったもので論文提出者の寄与は十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。



本研究で合成した新規環境感受性蛍光プローブ分子