

論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤 守俊

本論文は5章から成る。

第1章は序論であり、本研究の動機と目的が簡潔にまとめられている。まず多くの細胞内情報伝達過程は、 Ca^{2+} 、cAMP、 Zn^{2+} 、NOなどの蛍光プローブ分子による細胞内可視化検出を除き、多くは依然として十萬個以上の細胞の破壊分析によりなされていることを背景として述べられている。そのことを踏まえ、本研究では(1)主要なセカンドメッセンジャーの一つであるサイクリックGMP (cGMP) (2)蛋白質のリン酸化に基づく情報伝達、について新しい蛍光プローブ分子を開発し、蛍光顕微鏡下の生きた単一細胞でこれら情報伝達過程の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、細胞内cGMPの可視化蛍光プローブ分子開発について論じている。cGMPの選択的分子認識部位として、cGMPの結合により大きく構造変化をすることが知られるcGMP依存性蛋白質リン酸化酵素I α (PKG I α)を用いている。この構造変化を蛍光シグナル変化として抽出するためにオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 (GFP)の変異体で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)の優れたドナー・アクセプター蛍光団であるシアン色蛍光蛋白質 (CFP) および黄色蛍光蛋白質 (YFP)を、N- および C-末端にそれぞれ遺伝子工学的に連結している。

作製したcGMP蛍光プローブ分子は、培養細胞 (CHO-K1) 内で 10^{-8} ~ 10^{-3} Mの範囲のcGMP濃度変化に応答して、そのFRET信号を変化させることを示した。またcAMPに対して100倍近い選択性を示し、生理的cAMP濃度には妨害されないことを示した。更に、ヒト胎児腎細胞株 (HEK 293) を用い、一酸化窒素 (NO) の刺激によるcGMP産生およびcGMPホスホジエステラーゼによるcGMPの分解に本プローブ分子は可逆的に応答することを示している。またNO濃度変化に対しcGMPは必ずしもパラレルに変化せず、100nM NOC-7 (NOドナー) で刺激した際には、細胞内ではcGMP濃度振動が起こることを見出している。

本研究でのcGMP蛍光プローブ分子は、細胞内でのcGMP情報伝達の新たな発見・検証のみならず、生体内のcGMP濃度を制御する医薬品等の高速スクリーニングにも貢献すると期待される。

第3章および第4章は蛋白質リン酸化の蛍光プローブの開発に関する研究について述べている。

第3章では、有機合成を加味したアプローチについて述べている。インスリン受容体の細胞内基質蛋白質 IRS-1 のチロシン-リン酸化部位の一つからなる12残基の合成リン酸化ペプチド pY939とこのリン酸化部位を認識し結合するPI3-キナーゼのSH2ドメインを含むSH2蛋白質を、それぞれテトラメチルローダミン (T) とフルオレセイン (F) で蛍

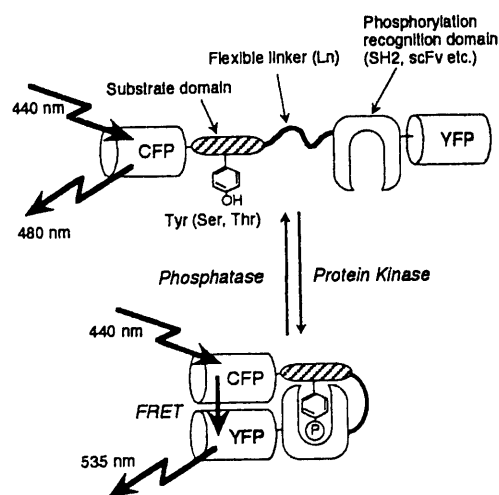
光標識した (T-pY939, F-SH2N) . この F-SH2N-T-pY939 錯体 (FRET pair) はインスリンの濃度依存的 ($10^{-9} \sim 10^{-6} \text{M}$) な基質ペプチド Y939 のリン酸化をその FRET pair の競争的解離を指標に可視化プローブできることを示した.

第4章は, 遺伝子工学的に蛋白質リン酸化を検出する蛍光プローブ分子を開発したことについて述べている. 本プローブは, 基質ドメインとして IRS のリン酸化配列 (Y941), リン酸化認識ドメインとして PI3-キナーゼの SH2 ドメイン (SH2n) を含み, インスリン受容体が本プローブ内のチロシン残基をリン酸化すると隣の SH2 ドメインがここに結合して本プローブ分子に大きな構造変化が起こる. この構造変化を N-および C-末端に連結した CFP と YFP 間の FRET を指標に検出する. ヒトインスリン受容体蛋白を発現させた培養細胞 (CHO-HIR) の 100nM インスリン刺激により細胞質の CFP/YFP 蛍光強度比は大きく減少したことより, 本プローブはインスリン受容体の優れた基質であり, インスリン受容体によるリン酸化に応答して CFP から YFP への FRET が増大することを示した.

本研究はプローブのリン酸化認識ドメインとしてインスリン情報伝達蛋白質の SH2n を用いたが, その他の細胞内に数多く存在するリン酸化認識ドメイン, あるいは抗体の可変領域 (scFv) を用いることにより, 蛋白質リン酸化に基づく情報伝達一般に適用可能な方法論として期待される. 第5章では総合的結論が述べられている.

このように本研究は, 細胞内情報伝達を可視化する新規蛍光プローブ分子の開発, とくに生細胞内 cGMP および蛋白質リン酸化の非破壊分析法の開発に関するもので, 理学の発展に大きく寄与する成果を収めた. よって博士 (理学) 取得を目的とする研究として十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.

したがって, 博士 (理学) の学位を授与できると認める.



蛋白質リン酸化を検出する蛍光プローブ分子の原理