

## 審査の結果の要旨

氏名 井上 尊 生

生体分子の機能解明には、遺伝学・薬理学・生化学的に、分子機能を不活性化する手法が有効である。レーザー分子機能不活性化法（Chromophore-Assisted Laser Inactivation, CALI）も生体分子不活性化法の一つであり、時空間解像度の高さが特徴である。すなわち CALI を用いると、適切な発現段階に適切な場所で、標的分子を瞬時にかつ特異的に不活性化することが可能である。したがって、ロックアウトにより胎生致死となる場合や代償機構が働いてしまう場合など、いままで解析が困難であった生体分子も CALI によってその機能を明らかにすることが可能であると考えられる。しかしながら、従来の CALI では抗体をプローブとするため、不活性化部位を制御できない事、細胞への導入が困難な事など種々の問題点があった。そのため CALI は有用性が示されながらも汎用されるには至っていなかった。これらの問題を解決するために、抗体の代わりに合成小分子プローブを用いることを計画した。合成小分子であれば、標的分子への距離、親和性の異なる様々な分子や膜透過型分子を合成することができるからである。イノシトール三リン酸受容体（inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, IP<sub>3</sub>R）を標的分子とし、IP<sub>3</sub> の1位のリン酸にクロモフォアであるマラカイトグリーンを結合させた CALI 用プローブ、MGIP<sub>3</sub> を新規に合成した。次に、モルモットの平滑筋組織を用いて CALI を適用し、MGIP<sub>3</sub> が CALI 用プローブとして有効に機能することを確認した。本来、CALI が最も効力を発揮するのは組織レベルではなく単一細胞レベルである。細胞は一様な構造体ではなく、細胞内局所での限定されたそして効率的な機能発現が重要であると近年考えられてきている。しかし、細胞内局所でのみタンパク質を効率的に不活性化する手法が CALI をおいて他にない。これらの利点を考慮し、本研究は小分子を用いた CALI により細胞内局所でのみ標的分子を効率良く不活性化できる新手法の開発を目的とした。

小分子を用いた CALI の原理について説明すると、クロモフォアで標識した合成リガンドを細胞に導入しレーザー光を照射する（図）。レーザー光のエネルギーを吸収するとクロモフォアはラジカル種を生成する。ラジカル種は非常に高い反応性を有しているため、周囲の生体分子と反応しこれらを通り不活性化する。またラジカルは水溶液中での寿命が非常に短いため近傍のタンパク質のみ、すなわちリガンドと結合した標的分子のみを特異的に不活性化する。

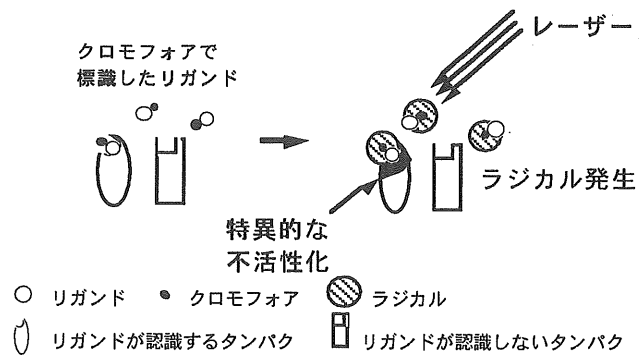


図 小分子CALI 模式図

### 1. 培養 B 細胞を用いた CALI

CALI 用プローブ MGIP<sub>3</sub> が培養 B 細胞（DT40）に発現している IP<sub>3</sub> 受容体を認識するかを検討した。その結果、IP<sub>3</sub> より約 7 倍弱いながら IP<sub>3</sub> 受容体を認識することが確認された。続いて DT40 細胞に CALI を適用した。まず、細胞のカルシウムシグナルを顕微鏡で蛍光観察下、CALI 用レーザーを照射できるシステムを構築した。DT40 細胞の IP<sub>3</sub> 受容体活性を測定後、MGIP<sub>3</sub> を添加しレーザーを照射した。その後、再び IP<sub>3</sub> 受容体活性を測定し、レーザー照射前の活性と比較したと

ころ顕著な受容体活性の低下が認められた。同様の実験を MGIP<sub>3</sub> 非添加またはレーザー非照射で行った場合や、IP<sub>3</sub> 受容体への親和性が非常に低い MGIP<sub>3</sub> の光学異性体 (1L-MGIP<sub>3</sub>) を添加してレーザー照射した場合には受容体の活性に変化は認められなかった。さらに、MGIP<sub>3</sub> を加えてレーザーを照射する際に IP<sub>3</sub> を共存させ、MGIP<sub>3</sub> の受容体への結合を阻害すると、活性の低下は抑制された。不活性化の特異性を調べるために、CALI をした際の Ca<sup>2+</sup>-ATPase のポンプ活性を同時に測定した。Ca<sup>2+</sup>-ATPase は IP<sub>3</sub> 受容体と同じ小胞体膜上に豊富に存在し、カルシウムを小胞体に取り込んでいる。測定の結果、IP<sub>3</sub> 受容体が抑制された条件においても Ca<sup>2+</sup>-ATPase の活性は影響を受けない事が示された。

## 2. 受容体不活性化の時空間解像度

MGIP<sub>3</sub>-CALI による不活性化の空間解像度を検証するために、レーザーを照射した細胞に隣接する細胞における IP<sub>3</sub> 受容体活性を測定した。前述のようにレーザーを照射した細胞では顕著な活性低下が認められた一方、隣接する細胞の活性には影響が認められなかった。次に時間解像度を検証するために、MGIP<sub>3</sub> の濃度を固定しレーザーの照射時間を変化させた際の不活性化効率を測定した。その結果、約3秒で細胞に発現している受容体の半分が壊される事が示された。

## 3. 単一細胞内局所における IP<sub>3</sub> 受容体不活性化

ラット副腎褐色細胞腫 (PC12 細胞) を用いて単一細胞内局所における IP<sub>3</sub> 受容体不活性化を試みた。PC12 細胞を神経成長因子により分化誘導後、ガラスピペットを用いて MGIP<sub>3</sub> を細胞内に添加した。その後、細胞体から細胞突起によって隔てられた成長円錐にのみレーザーを照射し、IP<sub>3</sub> 受容体活性を調べる為に細胞外液にブラジキンを添加した。その際の細胞体と成長円錐におけるカルシウムシグナルを Fura-2 によるイメージングにより解析した。その結果、レーザーを照射した成長円錐でのブラジキン応答が、レーザー非照射の場合に比べて有意に低下することが確認された。MGIP<sub>3</sub> 非添加で同様の実験を行った場合は、レーザー照射に伴う変化は見られなかった。本研究において、PC12 細胞内の局所において標的分子を不活性化できる事を示したが、単一細胞内の各部位によって役割分担がされている神経細胞の研究に MGIP<sub>3</sub>-CALI を適用する事で新たな知見を得られると考えられる。

以上、本研究において井上は、合成小分子とレーザー光によるタンパク質機能不活性化法を確立し、細胞下レベルでかつ秒のオーダーという従来の不活性化法では成し得なかった高い時空間解像度で標的分子を不活性化する事に成功した。合成小分子を用いた CALI の成功は本研究が世界でも初めてであり、様々な生体反応の解析手段として非常に有用となる事が期待される。これらの成果は細胞生物学、生物有機化学に広く貢献するものであり、博士 (薬学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。