

論文審査の結果の要旨

氏名 佐々木 和樹

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簡潔に述べられている。まずホルモンや神経伝達物質などの外部刺激によって誘起される細胞応答は細胞内シグナル伝達を介して行われていること、このシグナル伝達の多くが蛋白質リン酸化によって動的に制御されていること、この蛋白質リン酸化の生細胞内における非破壊可視化検出は、従来の大量の細胞を破壊し分離してから検出する方法では得ることのできない、生細胞内での時間・空間的な情報を得ることを可能にすることを順序立てて述べている。

この蛋白質リン酸化を担う酵素蛋白質はセリン/スレオニンリン酸化酵素とチロシンリン酸化酵素に大別され、後者には受容体型と非受容体型があることを踏まえ、本研究ではセリン/スレオニン酵素である Akt/PKB (以下 Akt) , 非受容体型チロシンリン酸化酵素である Src に対する蛍光プローブを開発し、蛍光顕微鏡下の生きた単一細胞でこれらの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 Akt 蛍光プローブの開発について論じている。Akt によるリン酸化を検出するために、Akt の基質蛋白質である Bad の Akt リン酸化部位 (S136) を認識 (結合) する 13-3-3 蛋白質を、リンカーで結んだ分子の N・C 末端にシアン・黄色蛍光蛋白質 (CFP・YFP) をそれぞれ連結した蛍光プローブを作製した。このプローブは Akt によって S136 がリン酸化されると 14-3-3 がリン酸化 S136 と結合することにより構造が変化し、その結果 CFP・YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が変化するため、Akt によるリン酸化が蛍光強度比変化として検出される。アポトーシス回避や血管保護作用に関与する Akt はインシュリンやステロイドホルモンによって活性化される。この活性化はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI 3-K) により制御される。活性化した Akt は内皮細胞一酸化窒素合成酵素 (eNOS) , Bad を含む様々な基質蛋白質をリン酸化するが、Akt がどのようにして基質蛋白質を選択的にリン酸化しているのはわかっていなかった。これらの Akt の基質蛋白質のほとんどが細胞内小器官に局在しているため、作製した Akt の蛍光プローブに基質蛋白質がもっている細胞内局在ドメインをつけることにより、その基質蛋白質のリン酸化を選択的かつ高感度に検出する蛍光プローブを開発し、Akt の基質蛋白質の選択的なリン酸化について論じている。すなわち、活性化した Akt は刺激物質依存的にゴルジ体やミトコンドリアなどの細胞内小器官に局在することを初めて明らかにしたこと、またこの活性化

Akt の局在化により選択的かつ高感度に Akt は基質蛋白質をリン酸化することの発見について述べている。

第3章は Src の蛍光プローブの開発について論じている。Src によるリン酸化を検出するために、Src 特異的にリン酸化される合成ペプチドとそのリン酸化ペプチドと結合する Grb2 蛋白質の SH2 ドメインを用いている。この2つの蛋白質リンカーで結んだ分子の N・C 末端にシアン・黄色の蛍光蛋白質 (CFP・YFP) をそれぞれ連結し、この分子が細胞質に局在するように C 末端に核外移行シグナル (NES) を連結した蛍光プローブを作製している。このプローブは、Src により合成ペプチドがリン酸化されると、そこにプローブ内の SH2 ドメインが分子内で結合しプローブの構造が大きく変化し、それを CFP・YFP 間の FRET により検出するものである。Src はエストロゲンやアンドロゲンなどのステロイドホルモン刺激で活性化し、Shc をはじめとする様々な下流の基質蛋白質のチロシンをリン酸化する。本研究で Src によるリン酸化を検出するための蛍光プローブを用いることにより、Src 活性化にはエストロゲンと上皮成長因子 (EGF) との同時刺激が必要であることを明らかにしている。さらに Src の活性化に EGFR がどのように関与しているか調べるために、上述のプローブに PTB ドメインをつけたプローブも開発し、エストロゲンリセプターと EGF リセプター (EGFR) が結合していることを発見した。このことは、Src はエストロゲン刺激において EGFR 結合ドメインをもった Src の基質をより選択的にリン酸化することを示している。一方、アンドロゲン刺激では Src の活性化に EGFR を必要とせず、基質の EGFR 結合部位の有無による選択性がないことを明らかにしている。第4章では、総合的結論が述べられている。

以上のように、本研究は、Akt および Src による蛋白質リン酸化の蛍光可視化プローブの開発を行い、それらを用いて、代表的蛋白質リン酸化酵素である Akt および Src は、細胞内小器官に局在することにより共局在している基質蛋白質を、高感度かつ選択的にリン酸化していることを明らかにした。これは理学の発展に大きく寄与する成果であり、博士 (理学) 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。