

論文審査の結果の要旨

氏名 上田 善文

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、ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP₃) やジアシルグリセロール (DAG) などの脂質セカンドメッセンジャーはホルモンや神経伝達物質などの細胞外刺激により産生され、細胞増殖やアポトーシスなどの細胞応答を制御していること、このシグナル伝達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。本研究では PIP₃ および DAG 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 PIP₃ の蛍光可視化プローブの開発と利用について論じている。PIP₃ を定量的に検出するために、シアン色蛍光蛋白質 (CFP), 黄色蛍光蛋白質 (YFP) をプローブに導入し、PIP₃ を選択的に認識する部位、脂質結合ドメイン (LBD) として PH ドメインを用い、CFP, LBD, YFP 間を剛直な α ヘリックスで連結している。このヘリックスに Gly-Gly を一箇所導入することによって、ここを起点にプローブ分子が回転できる。また膜局在シグナルを連絡することで細胞膜や細胞内膜にプローブを局在させ、それぞれの膜で PIP₃ 産生を測定できるようにしてある。このように遺伝子工学的に開発した PIP₃ 蛍光プローブは、産生した PIP₃ が LBD に結合するとプローブの構造が大きく変化するため、CFP, YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が変化し、PIP₃ の濃度が蛍光強度比変化として検出されることを示している。作製した細胞膜用および細胞内膜 (ゴルジ体膜, 小胞体膜) 用の2つのプローブが、細胞膜および PIP₃ の産生量をそれぞれ区別して定量できることを PIP₃ のマイクロインジェクション法等を用いて検証している。次に細胞膜用プローブが生理的刺激に応答するか観察するため、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) を発現させた CHO 細胞にプローブを発現させ、増殖因子 (PDGF) でその細胞を刺激して PIP₃ 産生を実際に検出している。また細胞内膜用プローブおよび PDGFR を発現させた CHO-PDGFR 細胞において PDGF 刺激を行い、約2分後に急激な PIP₃ の産生を検出している。またその量は、細胞膜におけるその2倍以上であることを示し、これにより PDGFR の活性化に伴う PIP₃ 産生は細胞膜のみならず細胞内膜においても起きていることをはじめて見出して

いる。またこのような細胞内膜での PIP_3 は、PDGFR のエンドサイトーシスを介して細胞内膜で *in situ* 産生されていることをはじめて明らかにした。

第3章は DAG の蛍光可視化プローブの開発と利用に関することが述べられている。PKC 由来の C1B ドメインを DAG のプローブのための LBD として用いているほかは、基本的に PIP_3 の蛍光可視化プローブと同様に設計して、DAG 蛍光可視化プローブを開発している。 PIP_3 と同様に細胞膜用、細胞内膜用との2種類の DAG プローブを作製し、これらを用い、細胞膜および細胞内膜での DAG 産生の動態分析を行っている。Mardin-Darby canine kidney (MDCK)細胞に細胞膜用プローブを発現させ、細胞外刺激の一つである ATP で MDCK 細胞を刺激したところ、20 秒以内に蛍光強度比が減少し、3 分以内に回復することを見出している。この一過性の DAG 産生を詳しく実験し、その機構を明らかにしている。更に細胞内膜用プローブを用いて、細胞外刺激により DAG が細胞内膜において産生することを見出している。すなわち MDCK 細胞に内膜用 DAG プローブを発現させ、それが ATP 刺激により約3分後に蛍光強度比が減少し、その後プラートに達することを見出し、このことより、DAG の細胞内膜での産生が PIP_3 と同様にエンドサイトーシスを介して起きることをはじめて明らかにしている。更に細胞外刺激のない状態についても、細胞内膜でエンドサイトーシスとは異なる機構で DAG が恒常的に産生していることもはじめて見出している。またそれらの生理的意味についても推察している。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 PIP_3 および DAG の生細胞内の蛍光可視化プローブの開発を行い、それらを用いて PIP_3 および DAG 産生についての細胞膜および細胞内膜における時空間検出をはじめて行った。 PIP_3 、DAG は細胞膜のみならずエンドサイトーシスを介して細胞内膜でも産生していることをはじめて明らかにした。これら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全員が認めた。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。