

論文審査の結果の要旨

氏名 金 誠培

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。外因性の内分泌攪乱物質 (endocrine disrupting chemicals; EDCs) が存在しており、近年、野生動物の生殖異常や催奇形性などの一因であることが指摘されている。その原因は、EDCによって細胞内シグナル伝達の恒常性が攪乱され、遺伝子発現の程度などに変化が起きるためと推定されている。本研究は、EDC 投与による情報伝達系の攪乱を、体系的に、かつ簡便にスクリーニングする方法の開発に関するものであること、具体的には、1) 生きた細胞内でのアンドロジェンリセプター (AR) の核内移行を指標にした EDC スクリーニング法の開発 (細胞系)、および 2) 黄色蛍光蛋白質 (YFP) 融合エストロジェンリセプター (YFP-ER) と DNA とのホルモン依存的結合を指標にした EDC 定量分析法の開発 (非細胞系) を目的とすることが述べられている。

第2章は、AR の核内移行を指標とした EDC のスクリーニング法のための生細胞内生物発光可視化プローブの開発と利用について論じている。本プローブは、生細胞内蛋白質の核内移行を可視化する機能をもつ生物発光蛋白質センサーで、遺伝子工学的に作製している。

シーパンジー由来のレニラルシフェラーゼ (RLuc) を分割し、その C 末側 (RLucC, 230-331 アミノ酸配列) とシアノバクテリア由来のスプライシング蛋白質 DnaE の C 末側 (DnaEc) をアンドロジェンリセプターAR に結合して、ミドリザル由来 COS-7 細胞の細胞質に局在させる。この細胞に RLuc の N 末側 (RlucN, 1-229 アミノ酸配列) と DnaE の N 側 (DnaEn) との融合蛋白質に Flag 抗原認識アミノ酸配列 (DYKDDDDK) と核内移行シグナル配列 (DPKKKRKV) を連結して発現させ、核内に局在化させる。プロテインスプライシング反応の効率を上げるためにスプライシングジャンクションにそれぞれ 6 アミノ酸配列 (KFAEYC) と 5 アミノ酸配列 (FNLSH) を導入した。細胞に男性ホルモンの一つ 5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) を添加すると、AR は DHT に結合して核内に移行する。この時 DnaEn と DnaEc が相互作用しスプライシング反応が起こり、RLuc の活性が回復する。この酵素活性を細胞膜透過性基質であるセレンテラジンを用いて生物発光強度により定量評価している。

作成した細胞アッセイ系で 13 種類の内因性・外因性男性ホルモンのアゴニストおよびアンタゴニストについて AR の核内移行量を生物発光強度から定量的に測定した。次に同様の方法

をマウス個体内のアンドロジェン活性検出に応用している。すなわち、N、C 末側融合蛋白質を共発現させた COS-7 細胞をマウスの局所（四肢、脳など）に移植し、生きた動物内で DHT 刺激により AR の核内移行に伴い、形成された RLuc による発光で、性ホルモン活性が非侵襲的に検出できることを示している。同時に、PCB やプロシミドンなどの化学物質が、血液脳関門を通過し脳室内に影響を与えることも明らかにしている。

従来、核内移行する蛋白質の可視化検出は GFP タッグ法で行われているが、本プローブはスプリット RLuc のプロテインスプライシングによる再構成に基づく生物発光検出であり、蛍光のバックグラウンドがなく、確度、感度が高く、また近赤外領域にかかった発光検出であるため、生細胞だけでなく生物個体にも応用できる優れた方法であることを検証している。

第 3 章は、エストロジェンリセプター (ER) と DNA との結合を指標とした EDC スクリーニング法の開発について述べている。ER が特異的に結合する DNA 配列 (estrogen response element; ERE) を固体基板上に固定化し、外因性エストロジェンアゴニストの結合により誘起される黄色蛍光蛋白質 (YFP) 融合 ER の ERE との結合を、蛍光により検出する非細胞系 (*in vitro*) システムを開発している。17 β -エストラジオールの 1.0×10^{-13} M が検出下限であり、他に 4 種類の外因性アゴニストについて有効性を検証している。第 4 章は、総合的結論である。

以上のように、本研究は、分割したレニラルシフェラーゼのプロテインスプライシングによる再構成を利用して、生細胞、個体中のリガンド誘起による AR の核内移行を生物発光強度で検出する方法、および固体基板上に固定化した DNA 配列 (ERE) と ER とのリガンド誘起による結合の蛍光検出法から成る。これらは理学の発展に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十分であると審査員一同が認めた。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。