

論文審査の結果の要旨

氏名 貝原 麻美

本論文は5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。細胞内シグナルのひとつであり様々な機能を担っている蛋白質間相互作用を検出することは重要であり、酵母 Two-hybrid 法の開発により多くの核近傍の蛋白質間相互作用が明らかにされてきた。その後、スプリットさせた β ガラクトシダーゼを用いる方法、プロテインスプライシングを用いる方法などが開発され検出対象となる蛋白質の種類を拡張してきた。これらの方法は蛋白質相互作用により精製するレポーター蛋白質自身あるいはその基質から生成される化合物が安定であり細胞内に拡散することから、蛋白質間相互作用の時空間解析は困難であった。生きた細胞内において蛋白質間相互作用を *in vivo* 時空間解析可能にするために、ウミシイタケ発光蛋白質 *Renilla luciferase* の生物発光を用いた方法の開発が本研究の目的であることが述べられている。

第2章は、生細胞内における蛋白質間相互作用の空間解析について述べられている。生物発光酵素蛋白質である *Renilla luciferase* を N 末側と C 末側の二つに切断し、その各々に相互作用を起こす蛋白質を結合した融合蛋白質を作製し細胞内に導入する。蛋白質間での相互作用により二つに切断されている *Renilla luciferase* が近接し酵素活性が部分的に回復、その結果、基質セレンテラジンを酸化し発光させることをインシュリンシグナル系において検証した。

すなわちインシュリンシグナル伝達の部分における IRS1 の 941 番目チロシンリン酸化部位周辺のアミノ酸ペプチド(Y941)と PI3K の p85 サブユニット SH2n ドメインの相互作用を検出している。細胞にインシュリンを添加すると、ペプチドがリン酸化され相互作用が起こる。この相互作用の検出を例に発光強度が増大する。*Renilla luciferase* の最適な切断位置を見出した。相互作用による *Renilla luciferase* の基質に対する発光酵素活性が可逆的であること、発光活性が Y941 のリン酸化による相互作用依存的事であることを確認している。この生物発光が即時一過性であったことより、生きた細胞内においてインシュリン添加による IRS1 と PI3kinase の SH2n ドメインの相互作用が細胞膜近傍のみでのみ起きていることを顕微鏡下で検出することに成功している。

第3章は、細胞内 Ca^{2+} 発光検出法に関するものである。細胞内の Ca^{2+} が引き起こすカルモデュリンと M13 の相互作用を split *Renilla luciferase* を用いて検出し、細胞内の Ca^{2+} の濃度変化を発光強度の変化として検出した。N 末側 *Renilla luciferase* にカルモデュリンと M13 を介して C 末側 *Renilla luciferase* を直列に連結させた1つの融合蛋白質を作製し、MCF-7 細胞に発現させた。細胞内 Ca^{2+} 濃度を一過性に上昇させることが知られている ATP あるいはヒスタミンを添加した場合、発光強度の増大が検出された。その増大は、速い一過性の細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇に対応するものであった。本方法により細胞

内 Ca^{2+} 濃度変化を本生物発光により検出することが可能であることが結論されている。

第4章は、ERK2の二量体形成過程の発光検出法についての記述である。重要な細胞内シグナルの最下流の蛋白質MAPKの一つであるERK2の二量体形成過程を検出した。ERK2は様々なシグナル経路を介してトレオニンとチロシンがリン酸化されることにより活性化する。リン酸化したERKは二量体を形成し迅速に核内移行し、蛋白質の発現を調整する様々な蛋白質を基質としてリン酸化することで、細胞の分化、成長、癌化を制御している。従来の方法では、その二量体形成過程をその場検出することは困難であった。本研究において、ERK2の二量体を生物発光により細胞内において可視化することを初めて可能にしている。

第5章は、本研究で開発した蛋白質相互作用の発光検出法の本人の今後の研究展望を簡単に述べている。

第6章は、本論文全体の結論である。生きた細胞内で、蛋白質間相互作用を生物発光時に検出するスプリット *Renilla luciferase* 法を開発し、これをインスリンシグナル経路における蛋白質間相互作用、細胞内の Ca^{2+} 依存的な蛋白質間相互作用の検出、および乳癌細胞内におけるMAPK経路の蛋白質の二量体形成過程の検出により方法の検証を行ったことをまとめている。

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。