

# 論文審査の結果の要旨

氏名 比田直輝

本論文は、遺伝子コード型蛍光プローブによる生細胞内でのナノモル濃度の一酸化窒素(NO)の可視化検出に関するもので、以下の4章より成る。

第1章は序論であり、NOの心血管系や神経系におけるその存在と機能について本論文の背景を述べている。さらにNO分析の従来法について特徴と性能について述べている。本研究の目的である生細胞内でのnM濃度の生理的濃度のNO動態を観察できる手法は、今まで開発されていないことを述べている。そして本研究の目的は、NOの結合タンパク質である可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の酵素活性による増幅能を備えたNOの超高感度蛍光プローブの開発と、それをを用いる単一細胞内でのnM領域NOの動態を可視化検出することであることを述べている。

第2章では、開発したNO蛍光プローブの設計、検出原理、検証、血管内皮細胞でのNO測定の実際について述べている。NOの結合タンパク質である可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)は、サブユニットとサブユニットのヘテロ二量体で構成されたcGMPの産生酵素である。sGCのN末端に存在するヘムにNOが可逆的に結合する。NOの結合によりsGCの酵素活性が上昇し、GTPを基質としたcGMPの産生が起きる。NO蛍光プローブを開発するにあたり、二つのキメラタンパク質を設計した。sGCとsGCのC末端にそれぞれcGMP蛍光プローブを遺伝子工学的に連結している。CGYはcGMPの結合タンパク質であるPKGIのN末端とC末端に青色、黄色の蛍光タンパク質CFP、YFPを連結したcGMP蛍光蛋白プローブである。cGMPの結合によりCGYの構造変化が誘起され、それに伴うCFPとYFP間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)をcGMP、すなわちNOの増幅された定量分析値の尺度にしている。このプローブをNOA-1 (a fluorescent indicator for NO with a signal amplifier)と名付けている。細胞内でsGC-CGYとsGC-CGYが二量体化して本プローブNOA-1が形成され、それがNOと結合して産生したcGMPを自身検出していることを明らかにした。既存の有機プローブと比較し、 $10^4$ 倍の感度でNOを可逆的に動態可視化検出できることを検証している。血管内皮細胞にNOA-1を発現させ、生理刺激によるNOの産生の動態観察を行っている。FRET強度はeNOSが発現していないCHO-K1細胞に比べて有意に低く、血管細胞内に定常的にNOが産生していることを見出した。NOS活性をNOS阻害剤L-NAMEで阻害したところ、FRET強度がCHO-K1のそれまで減少した。このことより、血管内皮細胞にNOが定常的に産生されていることを示した。このNO濃度はL-NAMEでeNOSの活

性を阻害して細胞内NOを完全に除去し、NOガスを溶解した標準液により検量したところ、血管内皮細胞に1 nM領域のNOが定常的に産生していることを見出した。

第3章では、NOA-1の応用として血管内皮細胞由来の持続的な低濃度NO(1nM)がどのようなメカニズムで産生されているかを研究した結果を述べている。生体から切り出した血管に、sGCの阻害剤やNOS阻害剤を加えると血管がさらに収縮を起こすことから、血管内皮細胞では低濃度NOが持続的に産生していると考えられている。このNOが欠如すると、高血圧や動脈硬化等の病気の原因になると考えられている。第2章で見出したように、このNO濃度は1 nM領域である。NOA-1によるNO動態の可視化検出の詳細な実験より、この血管内皮細胞の1 nM NOがPI(3)K-Aktシグナル伝達を主要な経路として産生していると結論している。

第4章では本論文の結論を以下のようにまとめている。増幅検知型の蛍光プローブNOA-1を開発し、細胞内のnM領域のNO動態を可視化検出することに成功したことを述べている。また血管内皮細胞において、1 nMのNOが定常的に産生していること、およびそのメカニズムを考察している。1 nMのNOは、血管を弛緩するのに十分であり、本研究の成果は血管の制御における低濃度NOの重要性に定量的基盤を与えたとしている。NOA-1は、その感度と可逆性において既存の有機プローブをはるかに凌駕し、血管内皮細胞のみならず神経細胞などNOシグナル伝達が重要な役割を果たす細胞内のNO動態を理解する重要な方法になると期待できる。

これらの研究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。