

論文審査の結果の要旨

氏名 古谷 昌広

ホスホイノシチドは生体膜を構成するリン脂質であり、細胞分裂や増殖、運動などの細胞の機能を制御するシグナル分子でもある。ホスホイノシチド代謝酵素の変異が癌や糖尿病などの疾患を引き起こすことが報告されている。従って、ホスホイノシチドの代謝を調べることは生物学だけでなく医学の発展にも繋がることになる。しかし、細胞内のホスホイノシチドは微量であるため高感度で簡便に測定する方法は樹立されていない。本論文では結合ドメインを用いて個々のホスホイノシチドを検出し定量する新しい方法論について述べられている。論文提出者は dot-blot 法と ELISA 法を用いてドメインの各ホスホイノシチドに対する特異性を調べ、2 面偏波式干渉計技術を用いてドメインとホスホイノシチドとの解離定数を求めた。その結果、PI(3)P のプローブとして Hrs 2×FYVE を、PI(4)P に対して FAPPI 2×PH を、PI(3,4)P₂ に対して TAPPI 2×PH を、PI(4,5)P₂ に対して PLC δ1 PH を、PI(3,4,5)P₃ に対して GRP1 PH ドメインが最適であると選定した。

次にこれらのドメインを用いて酵素活性の測定を行っている。従来の ELISA 法では脂質を蒸発乾固してプレートに固相化していたため不均一に脂質がコートされることになり再現性と定量性にかける方法であった。論文提出者はプレートを炭素鎖で前処理することで、蒸発乾固することなく脂質を固相化することに成功した。この方法を用いて PI(3,4,5)P₃ の 3 位のリン酸基を脱リン酸化する酵素である PTEN と、PI(4,5)P₂ の 3 位にリン酸基を付加する PI 3-kinase の活性を測定した。また、PI 3-kinase の阻害剤の阻害効果を調べることに成功した。このことは、この実験系がホスホイノシチド代謝酵素の阻害剤や活性化剤のスクリーニングに応用できることを示している。この方法の特徴は放射性同位体を用いることなく 1 つのプレートで反応、検出を行うことができるため、非常に簡便でありまた多くのサンプルを一度に扱うことができるという点が従来の方法と比べて大変優れている。

さらに論文提出者は TLC blot 法を改良し、細胞内のホスホイノシチドを定量している。TLC blot 法は細胞から脂質を抽出した後、TLC に脂質をスポットし展開してから熱と圧力をかけて脂質を PVDF 膜に転写する。その後、ドメインを用いてホスホイノシチドを検出するという方法である。悪性度の異なるマウ

メラノーマ細胞において悪性度が高まるにつれ PI(4,5)P₂ は減少し PI(3,4,5)P₃ が増えていることを示した。PTEN は p53 の次にヒトの癌での変異が報告されている遺伝子である。そこで実際に PTEN が機能していないヒト神経膠芽腫細胞の PI(4,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ 量を定量したところ、PI(4,5)P₂ 量には差が見られなかったが PI(3,4,5)P₃ 量には顕著な差があることが判明した。さらにこの PI(3,4,5)P₃ 量は代謝酵素の一つである PI 3-kinase (p110α)の発現量とは一致していなかった。このことはホスホイノシチド量が代謝酵素の発現量を単純に反映しているのではないということを示唆しており、ホスホイノシチド量を直接測定することの重要性を示している。これまでホスホイノシチド量の測定には放射性同位体標識法と質量分析法用いられていた。しかし、放射性同位体標識法は標識のできない生体試料のホスホイノシチドは測定できず、質量分析法は感度が悪く PI(3,4,5)P₃ などの微量ホスホイノシチドは測定できないという欠点を持つ。論文提出者の考案した定量法は PI(3,4)P₂ や PI(3,4,5)P₃ という微量ホスホイノシチドを放射性標識することなく高感度で簡便に測定することができ、既存の方法では不可能な癌組織などの生体試料でのホスホイノシチド代謝を調べられる唯一の方法であり、ホスホイノシチド代謝異常による疾患の診断や治療に応用できると考えられる。なお、本論文は伊藤俊樹、辻田和也、伊集院荘、竹縄忠臣との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、本研究が生物学だけでなく医学においても大きく貢献するといえ、本論文審査および学力確認の結果から博士（理学）の学位を授与することを適当と認める。