

論文審査の結果の要旨

氏名 菅野 憲

本論文は以下の6章より成る。

第1章および第2章は序論であり、本研究の背景、動機と目的が簡潔に述べられている。生命現象に関する情報の多くは生化学的分析法によりもたらされたものであるが、それは破壊分析であるがゆえに動的情報は損なわれていると述べた後、タンパク質スプライシング反応を起こすポリペプチド (インティン)を用いることで生細胞内の非破壊的タンパク質動態解析が可能となることを述べている。本研究では、(1) タンパク質間相互作用検出のためのインティンを介した発光プローブ、および(2) 生体のミトコンドリアからのタンパク質放出を検出するための発光プローブ、の開発を目的とすることが述べられている。

第3章は、タンパク質間相互作用検出のためのインティンを介したレポーター遺伝子プローブの開発について述べている。本プローブは以下の3つのキメラDNAから構成される。すなわち、(1) 特異的DNA配列に結合するタンパク質 modified LexA (mLexA) にインティン DnaE のN末側 (DnaEn)と検出対象タンパク質 X を連結した融合タンパク質のcDNA、(2) 転写活性化タンパク質 VP16AD にC末側 DnaE (DnaEc)と X の標的タンパク質 Y を連結した融合タンパク質のcDNA、および(3) mLexA-VP16AD が結合することでホタルルシフェラーゼ (Fluc)を産生しうるレポーター遺伝子である。X と Y が相互作用し近接すると DnaE がタンパク質スプライシング反応を起こし、新たに mLexA-VP16AD が組継がれる。この mLexA-VP16AD の作用に基づき産生された Fluc の酵素活性を X-Y 相互作用の尺度にしている。3種のタンパク質対をモデルとし、相互作用が起こる場合にのみ相対発光値 (RLU)が上昇することを示している。これに加え、上皮増殖因子 (EGF)により誘起される Ras-Raf-1 相互作用の検出において、EGF 濃度増加に応じて RLU も上昇することを明らかにした。また、従来の非破壊的タンパク質間相互作用検出法である two-hybrid 法、タンパク質相補法、タンパク質再構成法では Ras-Raf-1 相互作用を検出するのは困難であることを見いだしている。本実験では実施例として3種のタンパク質対を扱ったが、Fluc のcDNA を緑色蛍光タンパク質のcDNA に置き換え、蛍光標示式細胞分取器を用いることで、未知のタンパク質間相互作用同定

や特定のタンパク質間相互作用に影響を与えうる薬剤候補のスクリーニングを大量かつ高速に行えることを論じている。

第4章は生体のミトコンドリアからのタンパク質放出を検出するための発光プローブの開発について述べている。本プローブは、(1) ミトコンドリアタンパク質 Smac/DIABLO に、分割したレニラルシフェラーゼ (Rluc) の N 末側と DnaEn とを結合した融合タンパク質、および (2) DnaEc と C 末側 Rluc とを結合した融合タンパク質から成る。(1) が細胞質中へ放出されると、細胞質中の (2) に近接してタンパク質スプライシング反応が起き、Rluc が再構成される。Rluc の酵素活性をもって、タンパク質放出の尺度としている。ヒト乳ガン由来の MCF-7 細胞を用いて、スタウロスポリン依存的な Smac/DIABLO 放出に基づき RLU が上昇することを明らかにしている。さらに、生きたマウスでもこの現象を可視化検出できることを示している。本研究は Smac/DIABLO を実施例として取り上げたが、その概念は他の細胞小器官に局在するタンパク質に関しても適用可能であることを論じている。Smac/DIABLO はガンなどの病変に関わりがあることを述べた上で、本手法の応用例として、新規薬剤候補や細胞毒性を持つ化学物質のスクリーニングを挙げている。また、本プローブを全身に発現している形質転換マウスの作製により、成長過程においてみられる Smac/DIABLO 放出を検出することで、新たな生命現象解明の端緒となりうると述べている。

第5章、第6章はそれぞれ総合的結論、参考文献である。

以上のように、本研究では、インテインを利用した生体内でのタンパク質動態解析法の確立に関する研究を行い、(1) インテインとレポーター遺伝子とを組み合わせること、タンパク質間相互作用を高感度に検出可能であること、(2) インテインと分割 Rluc を利用することで、生きた細胞・個体でのミトコンドリアからのタンパク質放出が検出可能であることを明らかにした。これらの研究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、論文提出者が主体となっていたものであり、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。