

## 審査結果の要旨

氏名 荻野 新治

哺乳細胞内におけるタンパク質間相互作用を観測するための新規 In-cell NMR 測定法の開発と題する本論文は、哺乳動物細胞内におけるタンパク質間相互作用を NMR にて観測するための新規手法の確立に関する研究成果を述べたものである。本論文は、全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章においては、実験結果および結果に対する考察を記述している。第 4 章では、総括と今後の展望について述べている。

第 3 章においては、まず、哺乳動物細胞内にてタンパク質の NMR シグナルを観測するための細胞調製方法の確立を行っている。次に、細胞内に導入した Thymosin  $\beta$ 4 (T $\beta$ 4) の NMR シグナルの観測を行い、細胞内における T $\beta$ 4 の翻訳後修飾および、内在性 G-actin との相互作用について解析している。

In-cell NMR 法の確立のためには、高濃度のタンパク質を細胞内に導入する必要があるため、まず、Streptolysin O (SLO) による形質膜上のポア形成と Ca<sup>2+</sup> 刺激による膜の再生を応用して、293 細胞に対して T $\beta$ 4 を効率よく導入するための調製条件を探索し、また、FITC により蛍光標識した T $\beta$ 4 を細胞内に導入して、細胞内 T $\beta$ 4 濃度の見積もりを行っている。その結果、導入した T $\beta$ 4 は、細胞内濃度として約 50  $\mu$ M と見積もられ、この細胞の懸濁液を NMR 測定に用いた場合、シグナルの取得が可能な濃度域と判断している。さらに、細胞内に導入した T $\beta$ 4 が、細胞質中に分布していることを共焦点顕微鏡により観測し、また、T $\beta$ 4 が分解されていないことを SDS-PAGE による解析から明らかとしている。次に、均一 <sup>15</sup>N 標識 T $\beta$ 4 を導入した細胞を調製し、細胞内の T $\beta$ 4 の NMR シグナルの観測を試みている。調製した細胞は、密度勾配媒体である Redigrad を含む培地に懸濁することにより、経時的な細胞の沈降を抑制する工夫を行っている。これにより、細胞死の低減に加え、測定中の細胞の沈降による静磁場の不均一化の抑制が期待できる。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC スペクトルの測定の結果、10 時間の測定にて十分な感度にて T $\beta$ 4 に由来するシグナルの検出に成功している。測定後に、細胞を除いた細胞外液を同様の条件にて測定した結果、シグナルをほとんど与えなかったことから、観測されたシグナルは、細胞内の T $\beta$ 4 に由来すると判断し、哺乳動物細胞を用いた in-cell NMR 法の確立に成功したと結論している。

さらに、細胞内測定時とバッファー中の測定時の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを比較することにより、細胞内に導入した T $\beta$ 4 に関する解析を進めている。まず、細胞内測定時に、T $\beta$ 4 の N 末端領域のアミノ酸残基のみにおいて観測された特徴的な化学シフトの要因について解析している。生体内に発現する T $\beta$ 4 は、翻訳開始メチオニンの切断後、新しく N 末端となったセリン残基に対してアセチル化を受けることが報告されている。細胞内にて観測された T $\beta$ 4 の N 末端領域の化学シフトが、N 末端アセチル化 T $\beta$ 4 を測定した場合と同一であったことから、T $\beta$ 4 が細胞内にてアセチル化修飾を受けたことを示している。次に、細胞内導入時に T $\beta$ 4 の各アミノ酸残基に観測された化学シフト変化と、バッファー中にて T $\beta$ 4 に対して ATP 型あるいは ADP 型 G-actin を添加した場合の化学シフト変化の比較から、細胞内に導入した T $\beta$ 4 と内在性 ADP 型 G-actin との相互作用が検出されていることを示している。最後に、細胞内にて T $\beta$ 4 と ADP 型 G-actin との相互作用が観測された理由および、相互作用が検出されたアミノ酸残基の妥当性について考察している。

本研究にて確立した手法の適用により、これまでに試料調製が困難であった生体分子をターゲットとして、生体内の状態を保持した膜タンパク質やタンパク質複合体とリガンドとの間の相互作用解析に加え、アセチル化のみならず、リン酸化などの翻訳後修飾の経時的・定量的な解析に対する貢献が期待できる。

以上、本研究の成果は、構造生物学的な解析方法の発展に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。

〔別紙3〕

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

氏 名 荻 野 新 治

試験担当者全員は 荻 野 新 治 に対し、論文の内容およびその関連事項に関し、

種々試問を行った結果、 合格 と判定した。