

論文審査の結果の要旨

氏名 岡田 悟

本論文は4章からなり、第1章は研究のイントロダクション、第2章には研究結果について述べられており、前半ではアミノ酸用の FRET ベースのナノセンサーの開発について、後半では開発したヒスチジン用ナノセンサーの生体中での応用について記述されている。第3章は得られた研究結果の考察であり、第4章には、研究にもちいた実験の手順が述べられている。以下に、論文審査の結果を具体的に述べる。

細胞は細胞内外の環境に応じて代謝を制御する。代謝制御理解には、低分子代謝物動態データが不可欠であるが、従来の測定法は破壊的なステップを伴うため、連続動態観測に使用できない。代謝物を高い時空間的解像度で観測するためには、以上の問題を回避できるセンサー系が必要である。

この条件を満たすセンサーとして、FLIPs (fluorescent indicator proteins) とよばれるセンサーが既知である。FLIP は、低分子結合エレメントと、低分子結合を観測可能な現象に変換する出力エレメントからなる。結合エレメントとして、細菌由来の PBP (periplasmic binding protein) が利用されている。PBP は高い特異性・親和性をもち、リガンド結合によって構造変化を起こす。FLIP の出力エレメントとしては、2種の GFP 変異体が利用されている。低分子結合による構造変化を GFP 変異体間の FRET (fluorescence resonance energy transfer) 効率の変化として検出する。低侵襲であり、連続観測に好適である。

細胞内で利用できる FLIP 作成のためには、さらに以下のような条件が挙げられる。1) tunability: 親和性の改変可能性。2) reliability: 高いダイナミックレンジ。3) generality: 単純かつ一般適用できる設計原則。4) high resolution: 高い時空間解像度。

論文提出者は、酵母生細胞におけるアミノ酸濃度の動態観測を目的として、上記条件を満たすセンサーの開発を行った。

1. 上記の設計原則に基づいて、アミノ酸に対する FLIPs を作成した。大腸菌で FLIPs を発現後、精製し、*in vitro* で親和性・特異性を評価した。細胞内で使うためには、FLIPs の親和性を弱める必要があった。FLIP-HisJ を対象として、PBP 部分への変異導入による親和性の減弱を試みた。結果、生理的濃度範囲に親和性を持つ変異体を得た。また、結合シミュレーション結果に基づく変異導入により、ヒスチジン(His)への親和性を維持しつつ、特異性改善にも成功した。この結果は、FLIPs の親和性・特異性の改変可能性を示している。

2. FLIP の信頼性向上のため、PBP 部分に円順列変異(cp)を導入した、FLIP-cpPBP シリーズを作成した。cpにより、各蛍光タンパク質が別々のローブに結合した状態を作り出せるため、FLIP-PBP よりもダイナミックレンジが大きくなると予想された。実際に、FLIP-cpPBP シリーズは元の FLIP-PBP シリーズに比べてより大きなダイナミックレンジを示した。cp の導入によるダイナミ

ックレンジの拡大は、今回使用した全 PBP について有効だった。この結果は、PBP に対する cp が FLIPs の信頼性向上のために一般適用できることを示している。

3. FLIPs の生細胞における応用例として、酵母細胞の細胞質での His 濃度の動態観測を試みた。FLIP-HisJ を発現させた細胞では、センサー分子は細胞質のみに存在していた。FLIPs には細胞小器官を区別できる解像度があることを示している。

細胞への His 添加で FRET 比が変動することが観察され、その変動幅は添加した His 濃度と相関していた。この結果は、FLIP-HisJ によって細胞質への His 流入を観測できたことを示している。

また、FCM (flow cytometry) の利用により、S/N 比は約 2 倍向上し、前処理の必要のない、単純で迅速な測定が可能となった。

続いて、低分子が関わるシグナル伝達経路のモデルとして、GCN 経路を選択し、低分子動態と経路活性化状態の関係性を観測することを試みた。細胞質内の His 濃度 ([His]cyto) 変動と、GCN 経路活性化変動の間の時間差を見いだした。

最後に、細胞に対し、3 種類の刺激 (低温シフト、ラパマイシン、シクロヘキシミド) を加え、FCM 観測した。いずれの場合も、[His]cyto 上昇が観測された。この結果は、[His]cyto は、細胞外の His 濃度とは独立に変化し得ることを示唆する。タンパク質合成阻害に伴う His 消費速度の低下によって、余剰 His が生じている可能性が考えられた。

上記の内容から判断して、今回論文提出者が開発したシステムは低分子動態解析に資するものであり、代謝制御についての理解・代謝制御機構のモデル化に貢献できると考えられる。

なお、本論文は太田一寿氏、伊藤隆司氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を立案・実行したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (科学) の学位を授与できると認める。