

## 審査の結果の要旨

氏名 秋葉 宏樹

本研究は、希土類錯体を用いたチロシンリン酸化の新規検出法の開発を行ったものであり、錯体構造、認識特性、生体分子系の検出についての検討と評価を行うことを通して、検出法の特徴・有用性について明らかにしている。論文は序論、結果と議論、総括の3部構成である。

序論は第1章でチロシンリン酸化の選択的検出の意義と手法論、第2章で希土類錯体の発光特性についての背景説明を行い、併せて本研究の目的と手法について論じている。

タンパク質のチロシンリン酸化は細胞内シグナル伝達経路において大きな役割を果たし、その異常はがん等の疾患の原因といわれている。このため、リン酸化チロシン (pTyr) を検出することは分子生物学研究において大変重要である。さらに、チロシンリン酸化酵素 (プロテインチロシンキナーゼ: PTK) や脱リン酸化酵素 (プロテインチロシンフォスファターゼ: PTP) の働きを制御する化合物が抗がん剤等の医薬品として広く活用されつつあり、これらを効果的に選択する手法においても pTyr の検出は必要不可欠である。既に様々なリン酸化検出法が提案されているものの、pTyr 選択的な検出を汎用的に行う手法には限りがあった。そこで本研究では、テルビウム (Tb(III)) 錯体をプローブとして用いた手法を新たに採用することを提案している。

Tb(III)など希土類の錯体は、近傍に光エネルギーを吸収し伝える原子団が位置していると、可視光領域に強い発光を示す。本研究においては、pTyr のベンゼン環がこの役割を果たすことを利用して pTyr 検出系が構築された。この検出系では、リン酸化に伴い pTyr が Tb(III)錯体と相互作用することで、このエネルギー伝達が可能となり、強い発光が観測される。これがリン酸化されていない Tyr や、他のアミノ酸におけるリン酸化では働かないために、pTyr が選択的に検出される。さらに、適切な構造をもつ配位子によりヌクレオチド等の発光応答を示しうる夾雑分子の影響を抑えることが求められた。したがって、本研究ではまず選択的応答に効果的な錯体構造が探索され、そののちに物理化学的評価ならびに生体物質を用いた検出系へ展開された。

第3章から第5章では実験の結果ならびにその議論が論述される。

第3章においては、まず適切な構造をもつ Tb(III)単核錯体の構造が探求された。その結果、配位座の多い配位子を用いた安定な錯体を用いることが選択的な応答には必須であった。この中で、Tb-DOTAM が pTyr に対して効果的な応答を示すことが明らかとなった。この錯体は他のリン酸化アミノ酸やヌクレオチドには発光応答を示さない一方で、pTyr を加えると発光強度が大幅に上昇する。そして、ペプチドのリン酸化の有無が Tb(III)の可視光発光によって、目視でも確認できた。また、Tb-DOTAM と pTyr との相互作用について、リン酸基の Tb(III)に対する直接配位は確認されず、静電相互作用・水素結合によるものであることが明らかになった。発光滴定から求められる解離定数は 3.1 mM と、さほど強い相互作用ではなく、高感度の検出を行うためにはこれを向上させることが望まれた。

第4章では、pTyr との相互作用の強い Tb(III)錯体を求めて、複核錯体の探索と、その詳細評価が行われた。Tb-DOTAM を2つ連結させた構造を有する Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> は、pTyr との解離定数が 29 μM と、2桁強い相互作用であった。このために、pTyr に対する応答は Tb-DOTAM の7倍程度大きく、より高い感度の検出が実現された。Tb-DOTAM を用いた場合と同様の選択性は保たれており、選択的検出プローブとしてより優れていると述べている。さらに Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> と pTyr との相互作用において、等温滴定型熱量測定、エネルギー伝達効率の計算からは、2つの Tb(III)が pTyr のリン酸基に対して協同的に作用することが示唆され、Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> の構造の妥当性が示された。一方で発光の量子収率はさほど高くない、ペプチドのリン酸化への応答が配列依存的であるといった、本検出法の限界についても明らかにしている。

第5章ではまず、PTK、PTP による酵素的リン酸化、脱リン酸化反応のリアルタイム可視化とこれを利用した阻害剤の評価が行われた。Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> と基質ペプチド、ATP、Mn<sup>2+</sup>を加えるのみで、発光強度という指標によって両酵素の反応が可視化された。さらにこれらの酵素に対する阻害剤の働きについても、同手法を利用して定量的に表現され、手法応用の一つの有用な展開が示された。また、pTyr を認識するタンパク質の働きを可視化する実験も行われた。Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> 共存下、チロシンリン酸化ペプチドに対して、pTyr を認識する Src SH2 を作用させると、発光強度が有意に低下した。発光強度の低下を指標として、pTyr 認識タンパク質の認識現象を可視化することができた。しかしながら、タンパク質をターゲットとして用いた場合には、表面負電荷の影響によって Tb<sub>2</sub>-L<sup>1</sup> が非特異的に吸着することも判明し、タンパク質を対象に検出を行うことの限界も示されている。

第6章で研究の総括を行っている。本研究は、探索した Tb(III)錯体を用いた

pTyr の選択的検出、これを用いた酵素活性や認識タンパク質の働きの可視化を行ったものである。その中で、その認識メカニズムについても様々な分析化学的手法を用いて検討が行われた。このようなことから、本研究は新規な分子検出系の開発の端緒に位置づけられるものである。

よって本論文は、博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。