

## 審査結果の要旨

氏名 久保 智史

バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法による細胞内タンパク質間相互作用の観測と題する本論文は、NMR サンプル管内における細胞を生理的条件下に保つためのバイオリアクターを開発し、哺乳細胞内におけるタンパク質間相互作用を in-cell NMR 法によって観測した成果を述べたものである。本論文は全 5 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手法、第 3 章にバイオリアクターを用いた in-cell NMR 法の開発、第 4 章に in-cell NMR 法による細胞内タンパク質間相互作用の観測、第 5 章に全体の総括と今後の展望について記述されている。

本論文では、NMR サンプル管内の細胞を生理的条件下に保ちながら in-cell NMR 測定を行う手法を開発し、微小管結合タンパク質 CLIP-170 の微小管結合ドメインである CG1 を安定同位体標識して HeLa S3 細胞に導入し、内在性微小管との相互作用を観測することが目的とされている。第 3 章ではまず、NMR サンプル管内の細胞を生理的条件下に保ちながら NMR 測定を行うため、NMR サンプル管内にガラスキャピラリーを挿入し、サンプル管底部に細胞培養に用いる培地を常時供給するバイオリアクターを開発している。この時、バイオリアクターを用いて培地を灌流した場合でも、細胞を NMR サンプル管底部に保持するため、細胞懸濁液は温度可塑性のポリマーである Mebiol gel と混合し、ゲル内に封入している。また、ゲル化後も DMEM 培地の流路を保ち、効率よく培地成分を交換するため、細胞懸濁液は NMR サンプル管内においてコイル状にゲル化している。バイオリアクターを用いることによる細胞への影響を調べるため、 $^{31}\text{P}$  NMR 測定によってサンプル管内の細胞内に存在する ATP のシグナルを観測し、細胞内 ATP 濃度の経時的变化が調べられた。その結果、従来法で測定を行った場合は測定後 30 分で細胞内 ATP はほぼ枯渇したが、バイオリアクターを用いることで 22 時間経過後も初期濃度の 80% 以上の細胞内 ATP 濃度を保つことに成功している。また、バイオリアクターを用いた場合でも、細胞内に

導入した CG1 の高分解能な NMR スペクトルを取得することで、バイオリアクターを用いる事で、測定中に細胞外に漏出したタンパク質の影響を排除できたことが示されている。

第 4 章では、開発したバイオリアクターを用いた in-cell NMR 法により、細胞内における CG1 と内在性微小管との相互作用解析を目指している。バイオリアクターを用いることで長時間の in-cell NMR 測定が可能になったため、導入した CG1 における内在性微小管との相互作用部位を細胞内における転移交差飽和法 (in-cell TCS 法) により解析している。in-cell TCS 実験の結果、L77, I90, L92, V103, I117 において、相互作用を示す顕著なシグナル強度の減少が観測されている。これらの残基は CG1 の立体構造上において一定の面を形成し、報告されている CG1 の微小管相互作用界面と一致している。さらに、観測された相互作用が内在性微小管との特異的な相互作用に由来することを確かめるため、安定同位体標識 CG1 と同時にその 10 倍量の非標識 CG1 を細胞内に導入することによる、阻害実験を行っている。過剰量の非標識 CG1 を細胞内に導入することにより、微小管上の CG1 結合部位が非標識 CG1 によって占有され、細胞内分子との非特異的な相互作用の影響のみを観測することができるかどうかについては、微小管との相互作用を示すシグナルの化学シフト変化を指標として確かめられている。過剰量の非標識 CG1 存在下における in-cell TCS 実験の結果、L77, I90, L92, V103, I117 において観測されていたシグナル強度減少は抑制された。以上より、in-cell TCS 実験において観測されたシグナル強度減少は、内在性微小管との相互作用界面を反映していることが示されている。

以上の成果は、細胞内におけるタンパク質間相互作用を in-cell NMR 法によって原子レベルで解析した初の例であり、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。