

氏名	平山 祐
----	------

(論文内容の要旨)

ポストゲノム時代の到来とともに、生体物質の動的挙動を解明して、それが関与する生体内の様々の現象を解明する研究がますます活発化してきた。その中であって、タンパク質の役割に関する新たな知見が集積するにつれて、その構造と機能の相関を明らかにする手法への要請は高度なものとなってきている。電子常磁性共鳴法 (EPR 法) はタンパク質の構造変化とそれに伴う機能発現、あるいは細胞内におけるその局在の解明に用いられてきたが、その状況は蛍光顕微鏡法でも同様である。これらの手法では、タンパク質をスピンプローブや蛍光プローブと呼ばれるプローブ分子によって修飾し、それが発する信号を観測して修飾タンパク質の挙動を推定する。したがって精密な情報を得るためにはその挙動を正確に反映するプローブ分子が不可欠であるが、必要十分な機能を発揮するプローブ分子は少ないのが現状である。そこで、申請者は新たな設計をもとにスピンプローブ (第 1 章) と蛍光プローブ (第 2, 3 章) を合成する研究を実施した。あわせて、生体に重要な影響を及ぼす金属イオンの検出法 (第 4 章) も開発している。

第 1 章では筋肉タンパク質の一つであるトロポニン C のカルシウム結合に伴う構造変化を EPR 法により明らかにすることを目的として、新しい二官能基型スピラベル剤の合成を行った。これまでには、タンパク質に 1 点で結合する一官能基型スピラベル剤が用いられてきたが、タンパク質上でのその自由回転のため筋繊維中の配向を決定する際、あいまいさを残すという問題があった。これを克服するタンパク質に 2 点で結合する二官能基型スピラベル剤も少数ながら存在するが、水溶性が低いため使用は限定されていた。申請者は十分な水溶性を担保する二つのエーテル酸素原子を有する二官能基型スピラベル剤を設計し、市販のニトロ化合物から出発して 10 段階で目的物を合成した。その合成経路は、種々のリンカー長を有する類縁体へ容易に展開できる特長を有している。得られたスピラベル剤は期待通りの高い水溶性を有し、トロポニン C をラベル化できた。その EPR スペクトルから得られた  $2A_{zz}$  値 (ピーク分裂幅, 45 G) は一官能基型のもの (30~35 G) と比べ顕著に大きく、それから計算される回転相関時間はトロポニン C そのものの値に近かった。この事実から、本スピラベル剤はタンパク質に強く固定化されており、EPR による配向変化測定に有用であることが示唆された。

第 2 章では、蛍光一分子イメージング法によるタンパク質の配向変化観察を目的として、新しい二官能基型蛍光ラベル剤の合成を行った。本法ではタンパク質に結合した蛍光分子の双極子の配向変化を検出するが、既知の二官能基型ローダミン蛍光ラベル剤はプロキラルな構造を有するため、タンパク質結合時に分離困難な異性体を生成し、この分析結果に影響を及ぼすという問題点があった。そこで申請者は一様な形でタンパク質に結合する新しい二官能基型ロサミン蛍光ラベル剤を設計し、これを *m*r アニシジンから 8 段階で合成した。トロポニン C のラベル化部位のモデルペプチドにローダミン及びロサミン蛍光ラベル剤を作用させ、それらの結合様式を比較した。すなわち、ラベル化ペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析したところ、ローダミンラベル化剤は 2 種類のラベル化ペプチドを

氏名	平山 祐
----	------

与え、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 解析の結果、それらジアステレオマーの構造を推定することができた。一方、ロサミン蛍光ラベル剤は期待通りただ一つの生成物を与え、このラベル剤は蛍光一分子イメージング法に有用であると結論できた。

第3章では、小さい分子量の人工ペプチドタグと、それを認識する小分子プローブとの組み合わせに基づく、新しいタンパク質検出システムの開発を行った。現在広範に利用されている蛍光タンパク質はサイズが非常に大きく、導入したタンパク質の機能阻害などの問題点が指摘されている。小分子のタグ・プローブペア技術はそれを補完するものと期待されるが、十分なシグナル応答を示すものは現在のところ数少ない。本研究では、希土類錯体がペプチドタグと結合し、タグ中のトリプトファンからの特異的なエネルギー移動から生じる発光応答を示すタグ・プローブペアを考案した。サイクレンから出発して、8段階でプローブ希土類錯体を合成した。亜鉛イオンを介してこのものの二つのタグ結合部位が結合する際、ペプチドタグ中にポリアスパラギン酸構造が有効であることを実験的に示した。また、タグ中のトリプトファン残基からの特異的なエネルギー移動によって、十分なシグナル・ノイズ (S/N) 比を有する希土類発光が観測された。グルタチオン-S-トランスフェラーゼにこのペプチドタグを導入して、本プローブの有効性を試したところ、期待通りの特異性が発揮された。また、細胞内在性物質の夾雑下でも標的タンパク質の特異的検出が可能であることがわかり、本タグ・プローブペアの実際的な利用の可能性が示された。

第4章では金クラスターを利用した水銀検出センサーの開発を行った。溶液中の金クラスターは分散時に赤色を、粒子同士が凝集すると青色を呈し、これを利用する簡単な比色分析法を考案した。まず、親水性のトリエチレングリコールをリガンドとする水溶性の金クラスターを調製した。これに各種金属イオンを加えたところ、水銀イオンのみが水溶液の色を赤色から青色へ変化させた。紫外可視吸収スペクトル法によって、この色変化はラグフェイズを経たのち、急激に起こることがわかった。色の変化前後の試料を透過型電子顕微鏡で観察したところ、粒子の凝集とともに粒子径が増大していることが明らかとなった。また、反応後の試料を質量分析したところ、トリエチレングリコールと水銀イオンの錯体が検出された。以上のことから、水銀イオンが金表面からリガンドのトリエチレングリコールを引き抜くことで金粒子が不安定化し、それによって金粒子の成長と凝集が起こり、色の変化が誘起される反応機構を示すことができた。

以上のように、本研究においては分子の配向制御に焦点を合わせ、2点結合によってその最適化を目指すという統一的な分子設計のもと、各種修飾分子の開発の指針を打ち立てること成功した。

氏名	平山 祐
----	------

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、有機合成化学的手法を活用して、タンパク質の構造と機能の解明に貢献するツール分子の開発を目指し、各種プローブの合成法とそれが備えるべき物性に関して基礎的研究を実施した。具体的には、EPR 測定のためのスピンプローブ (第 1 章)、蛍光顕微鏡観測のための蛍光プローブ (第 2 章)、そして標的タンパク質を特異的に発光させるタグ・プローブ系 (第 3 章) を研究対象に取り上げた。そこには、標的タンパク質とプローブを 2 箇所 で結合させ、望ましい結合の配向と安定性を獲得しようとする統一的な分子設計思想があり、その着眼の妥当性は実験的に支持されたと評価できる。また、これら研究に関連して水銀イオンのユニークな検出法も提案している (第 4 章)。

第 1 章では、生理的条件下で機能する二官能基型スピララベル剤の開発を目指し、ニトロキシドラジカル骨格に反応性官能基を有するリンカー部を導入する従来の合成経路と異なる、独自の設計指針を考案している。すなわち、水溶性を保證するリンカー部を中心に考え、その一端にラジカル部位を、もう一端に反応性官能基を構築しようとするものである。この合成方略では原料の選択が鍵となるが、安定性と分子変換に対する柔軟性を併せ持ったものを適切に選択し、目的物を実用的収率で得ることに成功している。また、これを用いたトロポニン C のラベル化は円滑に進行し、期待された EPR スペクトルも得られ、申請者の提案は合理的であると評価できる。

第 2 章では、既知の二官能基型蛍光ラベル剤によるタンパク質のラベル化に際する立体異性体出現の問題を取り上げ、この問題のためにラベル化タンパク質の物性が一様でなくなり測定に悪影響を及ぼすことを実験的に示し、これを克服する新たなラベル剤を提案している。すなわち、ベンゼン環にカルボキシ基を有するローダミン骨格を基盤とする従来型のラベル剤と、それが無い新規ロサミン型ラベル剤を合成した。その合成経路は申請者独自のものであり、収率と簡便性において既知の方法から大きな向上が見られる。ラベル時におけるそれらの比較はきわめて実証的で、モデルペプチドと各種機器分析を駆使した検討は詳細を極めており、推定された立体異性体の空間的構造はそれらの物性の違いを十分説明していると判断できる。今回合成した新規二官能基型蛍光ラベル剤は安定性、水溶性及び蛍光量子収率に関する要請を満足していることも実験によって示しており、その有用性は十分評価できる。

第 3 章では、遺伝子操作によって導入したペプチドタグと、それを特異的に認識する結合部位と発光部位である希土類錯体を連結した蛍光プローブの組み合わせを、新しいタンパク質検出システムとして提案している。この種のプローブの特長は、両者の会合によってはじめて発光することで、バックグラウンドの小さな検出システムと期待されるが、使用条件が厳しく実用化されているものはない。亜鉛イオンを介したタグ中のアスパラギン酸とプローブ中の二つのビスピリジルメチルアミン部位の特異的結合、タグ中のトリプトファンからプローブ中のテルビウムへのエネルギー移動、その長寿命の発光の観測が申請者の設計の本質であり、合理的かつ独創的と評価できる。合成ペプチドを用いたモデル実験において、複合

氏名	平山 祐
----	------

体からの十分な S/N 比を有した発光応答を観測しているだけではなく、熱量測定実験を独立して実施して複合体生成に関する熱力学パラメータも決定している。これら実験はきわめて精密であり、実際のタンパク質への応用を含めて、良好な発光を得る条件に関する結論は合理的である。

第4章では、調製した安定な金クラスター水溶液が水銀イオンの添加によって、その色調を変化させる事実を見出し、これが比色分析センサーとして機能することを述べている。紫外可視吸収スペクトルと透過型電子顕微鏡観察から、その色調変化の反応機構を推定しているが、その結論は綿密な実験と入念な考察に基づく合理的なものと評価できる。

以上のように、本学位申請論文は生体の重要な物質のプローブ分子研究において、新たな局面を開いたものと評価できる。なお、本論文を構成する重要な部分は既に学会誌に掲載され、高い評価を受けている。

また本学位申請論文は、人間と環境との良好な関係を創生する自然科学考究を目的とする相関環境学専攻、分子・生命相関論講座の理念にかなったものと言える。

よって本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成21年1月19日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行なった結果、合格と認めた。