

## (論文内容の要旨)

本論文は、時間・空間的な要素を踏まえた形で、タンパク質等の生体高分子を“その場”観察するための磁気共鳴法に基づいた手法の開発を試みており、その研究成果をまとめたものである。本論文は、4部4章から構成されている。

第1部は序論であり、タンパク質分子の詳細を明らかにするためには“その場”観察、つまり、時間・空間的な要素を踏まえて解析を進めていくことが重要で、そのための手法として磁気共鳴法を用いることが有効であることを示し、本論文の導入としている。

第2部第1章では、メチル化DNA結合ドメイン(MBD)とメチル化DNAの複合体における動的挙動について、その詳細な解析を行っている。立体構造上の対称性を持たないMBDは2回対称軸を持つメチル化DNAに結合しうる。この複合体に対して2次元NOESYスペクトルを測定したところ、異なるDNA鎖の水素核間において化学交換現象が観測された。これは、複合体中において、2本のDNA鎖が交換していること、つまりMBDが「メチル化DNAから一旦解離後、180度異なる向きで再結合する」という過程が繰り返されていることを意味する。この交換現象の詳細を明らかにするため、NMRによって見出された交換速度と、複合体の解離速度との比較を、熱力学的・速度論的な側面から定量的に行なった。その結果、MBD-メチル化DNA複合体の解離速度の数百倍の頻度でその複合体の状態交換が起こっていることがわかった。これからMBDはDNAと緩やかに結合した“中間状態”を経由して、DNA鎖上で180度向きを変えるフリップ運動をしていることが明らかになった。

第3部では、磁気共鳴法による細胞内におけるタンパク質の観察のための手法開発に関する研究を記述している。

まず、第3部第2章では、ヒトの細胞を用いたin-cell NMR法の開発とその応用について記述されている。In-cell NMRとは細胞内蛋白質の選択的な高分解能異種核多次元NMR測定で、蛋白質の構造・挙動の原子レベルでの解析を可能にする。申請者は、HIV-1ウイルスのTat1蛋白質由来の細胞透過ペプチドを利用して、高効率に安定同位体標識された蛋白質を細胞質に導入することで、世界に先駆けて哺乳動物細胞におけるin-cell NMR測定に成功した。またその過程で、pyrenebutyrateによる細胞処理、細胞質における細胞透過ペプチドの切断が、目的蛋白質の細胞質・核質への均一な導入に必須であることを見出している。これはin-cell NMRのみならず細胞工学の観点からも有用な知見である。次に、上記手法を用いて、細胞内における①タンパク質-タンパク質相互作用、②タンパク質-薬剤相互作用、③タンパク質のフォールディングの安定性について調べている。まず、①タンパク質-タンパク質相互作用の検出では、野生型ユビキチンとその変異型とのNMRスペクトルの比較を行ったとき、野生型ユビキチンのNMRスペクトルにおいて、シグナルの広幅化が起こっていることが分かった。これは細胞内の野生型ユビキチンが、細胞内在性のタンパク質と特異的な相互作用をしていることを意味し、細胞内におけるタンパク質間相互作用の検出に成功したとみなせる。

次に、②タンパク質―薬剤相互作用の検出では、FKBP12 という、FK506 やラパマイシン等の免疫抑制剤に特異的に結合するタンパク質を用いた。FKBP12 の in-cell NMR 実験において、細胞外より投与した 2 種類の免疫抑制剤に対して FKBP12 が細胞内でそれらを認識している様子を検出することに成功した。また、この結果は in-cell NMR を用いて薬剤探索研究や薬剤輸送研究のために有用な知見を得ることができる事を示している。

最後に、③タンパク質のフォールディング安定性の解析では、それを重水素/軽水素交換実験によって調べたところ、ユビキチンは細胞内では試験管内に比べて極めて不安定であることを示す結果を得た。タンパク質の立体構造は、一般に細胞内のほうが安定化する傾向にあると信じられてきたが、申請者の実験結果はそれを真っ向から否定したことになり、この研究分野において一石を投じるような発見をしたことになる。

第3部第3章第4章では、ナノメートル分解能の核磁気共鳴イメージングを目指した磁気共鳴力顕微鏡(MRFM)のための要素技術開発を行っている。まず第3章では、MRFMの磁気共鳴信号を検出する上で、検出感度に直結する重要な要素技術であるカンチレバーの振動制御を、簡便かつ有効行うためのアクティブ除振システムの構築を行った。このシステムの要点は、高速演算処理を行いリアルタイムの制御を可能にする digital signal processor (DSP)の利用と、カンチレバーの振動制御、すなわち励振と除振に関して光ファイバーから放出されるレーザーから照射される光に付随する力を利用した方法の適用である。このシステムを利用することにより、突発的に発生する不都合な振動を制御し、より高感度に MRFM 信号を取得することができるようになった。次に第4章では、磁気共鳴力の勾配を、カンチレバーの共振周波数を計測することによって評価する方法を検討し、検出される信号の線形の詳細を解析した。その結果から、検出系のセットアップの違い、つまり外部磁場の方向に対するカンチレバーの振動の向きの違いによって、検出された信号の線形が、過去に報告されているいくつかの例とは異なることがあり得ると示した。ここで得られた知見は、MRFM 信号をもとに画像構築を行う際に重要である。

第4部では、全編を通じての総括と、磁気共鳴法によるタンパク質の“その場”観察の意義を示すとともに今後の展望を議論している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、時間・空間的な要素を踏まえた形でタンパク質を“その場”観察するための磁気共鳴法を利用した手法開発に関する研究を論述したものである。この研究で得られた成果は以下のとおりである。

1. 立体構造上の対称性を持たないメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) と 2 回対称軸を持つメチル化 DNA の複合体における動的挙動を、速度論的・熱力学的に解析した結果、MBD-メチル化 DNA 複合体の解離速度の数百倍の頻度でその複合体の状態交換が起こっていることを示した。これから MBD は DNA と緩やかに結合した“中間状態”を経由して、DNA 鎖上で 180 度向きを変えるフリップ運動をしていることを明らかにした。
2. ヒトなどの哺乳動物の生きた細胞内における蛋白質の新規な計測手法である in-cell NMR の開発をし、その手法を細胞内タンパク質の相互作用、安定性の研究に適用した。申請者は、細胞透過ペプチドを利用して、高効率に安定同位体標識された蛋白質を細胞質に導入することで、世界に先駆けて哺乳動物細胞において特定のタンパク質の選択的な高分解能 2 次元 NMR スペクトルを測定することに成功した。加えて、その in-cell NMR によって目的タンパク質の細胞内在性蛋白質あるいは薬剤との相互作用、さらにタンパク質の立体構造の安定性、が解析できることも示した。
3. ナノメートル分解能の核磁気共鳴イメージングを目指した磁気共鳴力顕微鏡 (MRFM) のための要素技術開発を行った。1 つは、MRFM の信号検出部分として最も重要なカンチレバーの振動を光照射によって実時間制御する手法開発であり、もう 1 つは、磁気共鳴力の勾配によって生じるカンチレバーの振動周波数変化として取得される MRFM 信号の、線形性に関する詳細な解析である。

以上、磁気共鳴法による蛋白質のその場観察のための手法を開発し、その過程で蛋白質の立体構造・動的構造を解明した本論文の内容と成果は、学術上の意義に加えて、工学的な応用への基礎に資する意義を認めることができ、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。