

京都大学	博士（工学）	氏名	栗下泰孝
論文題目	Development of Molecular Tools for Analysis and Imaging of ATP and Other Biomolecules Based on Coordination Chemistry （ATP 等の生体分子の解析・イメージングのための配位化学に基づいた分子ツールの開発）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>生体内には多種多様な生体分子が存在し、様々な役割を担っている。例えばアデノシン三リン酸（ATP）は細胞内においては必須のエネルギー源として、細胞外においてはシグナル伝達物質として機能している。また、生体内には数多くのタンパク質が存在しており、それらが相互作用することによって生体の恒常性を維持している。そのため、生理条件下でこれら生体分子を解析できる分子ツールの開発は生体機能の理解のために必須である。申請者は、金属錯体の持つ分子認識や反応に関する特徴的な性質に着目し、それを活用した ATP 及びタンパク質の解析・イメージングのための分子ツールの開発を行った。本論文は、これらについてまとめたものであり、序論、本論（四章）、結論から構成される。</p> <p>第一章では、試験管内及び細胞内において ATP などのポリリン酸種を検出可能な共鳴エネルギー移動（FRET）型レシオ蛍光プローブの開発を行った。本蛍光プローブは、その分子内にリン酸種認識部位として亜鉛ジピコリルアミン（Zn(II)-Dpa）錯体を、蛍光スイッチング部位かつ FRET アクセプターとしてキサントレンを、FRET ドナーとしてクマリンを有している。この蛍光プローブは、ATP などポリリン酸種と結合する前はクマリンとキサントレンとの重なり積分がほとんどないため FRET がわずかにしか起こらない。しかし、それらポリリン酸種と結合することにより、両者間での重なり積分が増大し、FRET が効率的に起こるようになる。有機合成によって得られた蛍光プローブを分光学的に評価したところ、ATP などポリリン酸種に対するレシオ蛍光プローブとして機能することが明らかとなった。さらに、本蛍光プローブを用いてプロテインキナーゼや糖転移酵素などの酵素反応の速度論的解析が行えることを実証した。また、細胞内の ATP 濃度変化のイメージングによる解析が可能であることを示し、細胞種によって依存する ATP 合成経路が異なることを明らかにした。</p> <p>第二章では、細胞表層における ATP などポリリン酸種の動態を解析できる蛍光プローブの設計及び開発を行った。本蛍光プローブは第一章同様に、リン酸種認識部位として Zn(II)-Dpa 錯体、蛍光スイッチング部位としてキサントレン、さらに細胞表層に局在させるためにオレイル基を有している。有機合成によって得られた蛍光プローブをリポソーム上に担持させ、分光学的に評価した。すると、ATP などポリリン酸種と結合することによってその蛍光強度を増大させた。また、本蛍光プローブは、細胞外液に添加するだけで速やかに細胞表層に局在し、マイクロ M 程度の ATP を蛍光イメージングにより解析できることを示した。さらに、本蛍光プローブを用いることでネクローシス初期における細胞内からの ATP 放出を可視化・解析することにも成功した。</p> <p>第三章では、ミトコンドリア内のポリリン酸種の動態を解析できる蛍光プローブの開発に成功した。第一、二章と同様にリン酸種認識部位として Zn(II)-Dpa</p>			

錯体を用いたが、蛍光スイッチング部位としては、ミトコンドリア局在性のあるローダミン骨格を利用した。有機合成によって得られた蛍光プローブを分光学的に評価したところ、ATP などポリリン酸種と結合することで蛍光強度を増大させることを明らかにした。この蛍光プローブは、細胞外液に添加するだけで自発的かつ効率的にミトコンドリアに局在した。本蛍光プローブのこれらの特徴を活かし、アポトーシス初期におけるミトコンドリア内の ATP 濃度上昇を観測することに成功した。さらに、第二章で開発した細胞表層局在蛍光プローブと合わせて使用することで、異なるオルガネラにおけるポリリン酸種のマルチカラーイメージングにも成功した。

第四章では、金属錯体触媒を用いた生体分子の新規な化学修飾法の開発を行った。化学修飾法として、カルベノイド転移反応に着目した。本反応では、金属錯体触媒によって生成された高反応性中間体カルベノイドが、生体分子内の官能基と反応することによって化学修飾が達成される。まず、生理条件下で機能するカルベノイド転移触媒の探索を行った。その結果、カルベノイド転移触媒としてコバルト-ポルフィリン錯体、その基質として α ジアゾカルボニル化合物が有効であることを見いだした。さらに、本反応をリガンド指向にすることで標的タンパク質を選択的に化学修飾できることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、錯体化学の持つ分子認識や反応に関する特徴的な性質に着目し、それを活用したアデノシン三リン酸 (ATP) 及びタンパク質の解析・イメージングのための分子ツールの開発を行っている。得られた主な成果は以下の通りである。

1. 試験管内及び細胞内において ATP などポリリン酸種を検出可能な共鳴エネルギー移動 (FRET) 型レシオ蛍光プローブの設計及び開発を行った。本検討により、被検出物と結合することで色素間での重なり積分を変化させるという、レシオ型蛍光プローブの分子設計指針を示した。有機合成によって得られた蛍光プローブを用いて試験管内のポリリン酸種を蛍光レシオ変化として検出できただけでなく、酵素反応の速度論的解析が行えることを実証した。さらに、細胞内の ATP 濃度変化の蛍光イメージングによる解析が可能であることを示し、細胞種によって依存する ATP 合成経路が異なることを明らかにした。
2. 細胞表層やミトコンドリアといった細胞局所における ATP などポリリン酸種の動態を解析できる蛍光プローブの設計及び開発を行った。本検討により、本来は細胞局所への局在性を持たない蛍光プローブに対し、局在化タグを導入することによって、それらの細胞内における局在を任意に制御できることを示した。有機合成によって得られた蛍光プローブは、細胞表層もしくはミトコンドリアに自発的かつ速やかに局在した。さらに、これらの蛍光プローブを用いることで細胞表層やミトコンドリアなど細胞局所における ATP 濃度変化を蛍光イメージングにより解析することにも成功した。
3. 金属錯体触媒を用いた生体分子の新規な化学修飾法の開発を行った。化学修飾法として、カルベノイド転移反応に着目し、生理条件下で機能するカルベノイド転移触媒の探索を行った。その結果、カルベノイド転移触媒としてコバルト-ポルフィリン錯体、その基質として α ジアゾカルボニル化合物が有効であることを見いだした。さらに、本反応をリガンド指向にすることで標的タンパク質を選択的に化学修飾できることを明らかにした。

本論文は、ATP 等の生体分子の解析・イメージングのための配位化学に基づいた分子ツールの開発を行っており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、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 26 年 1 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

[要旨公開可能日：2014 年 3 月 24 日以降](#)

