氏　名	坂口　怜子

（論文内容の要旨）

本論文は、生体高分子を用いて作製した細胞内情報伝達分子に対する蛍光性バイオセンサーを用いて、細胞内で複雑なネットワークを形成している情報伝達分子の濃度挙動を生きた単一細胞内で光学的にリアルタイム計測する方法論について研究をすすめ、多くの有用な知見を得た結果についてまとめたもので、序論、それに続く 6 章と総括からなっている。

序論では、次世代バイオエネルギーの要となる生物の高効率な物質変換機構を制御する生体内情報伝達経路についての現在までの知見、細胞内情報伝達分子を生きた細胞内で検出する意義と、これまでの細胞内バイオセンサーの研究例を論じている。生物は、外部からの刺激に応じて酵素を細胞内で産出し、出発物質から何段階かの中間生成物を経て最終生成物を産出する一連の化学反応を進行させ、高効率な物質変換を実現している。これらの酵素群の産生は細胞内情報伝達分子により制御されている。情報伝達分子の時空間的な挙動を細胞内でリアルタイムに捕捉する方法論を確立することにより、酵素を触媒とした多段階の物質変換システムを制御する情報伝達経路が解明できると期待される。

第 1 章では、タンパク質の転写・翻訳の制御など、細胞応答の根幹に関わる細胞内情報伝達分子であるイノシトール四リン酸（IP_4）の濃度変化を蛍光強度変化として検出できるセンサーを、天然の IP_4 受容体タンパク質の三次元構造情報にもとづき合目的なアミノ酸改変および化学修飾を加える事によって開発した。IP_4 センサーは、バイオセンサーに求められる特性である安定性と IP_4 に対する高い選択性、適切な親和性を有しており、蛍光による細胞内 IP_4 濃度変化の検出に適していることが示された。

第 2 章では、蛍光性 IP_4 センサーが、ヒト由来 HeLa 細胞内で利用可能である事を示した。細胞に導入した IP_4 センサーは、細胞内 IP_4 産出を誘起するヒスタミン刺激に応答した蛍光強度変化を示した。IP_4 センサーの蛍光応答は、試験管内におけるセンサーの IP_4 濃度依存的な挙動とよく一致した。ヒスタミン刺激に応答した蛍光経時変化は、既存の多数の細胞を破砕することによる IP_4 定量法から得られた結果とよく一致した。また、細胞内 IP_4 産出を促す酵素の阻害剤を用いた場合には、IP_4 センサーの蛍光応答はみられなかった。IP_4 センサーを用いることにより、既存の手法では検出不可能であった、生きた単一細胞内における IP_4 濃度変化の計測に成功した。これは単一細胞内 IP_4 挙動の計測に関する初めての報告であり、今後 IP_4 センサーを用いて、細胞内の情報伝達における IP_4 の機能解明が進展することが期待される。

第 3 章では、細胞内で、IP_4 センサーを用いることにより、IP_4 産出酵素の新規阻害剤の評価を行った。これまでに、IP_4 産出酵素を欠如させることにより、細胞内 Ca^{2+} 応答阻害や、免疫細胞発達の遅延などが引き起こされると報告されており、この酵素は細胞内情報伝達において重要な位置をしめると考えられる。アウリントリカルボン酸（ATA）は、試験管内

においては IP_4 産出酵素を阻害することが報告されているが、細胞内での IP_4 産生酵素に対する阻害能については報告例がない。本章では、HeLa 細胞に導入した IP_4 センサーを用いて IP_4 濃度変化を計測することにより、実際に細胞内でも ATA によって IP_4 産出酵素が阻害されることを証明した。

第 4 章では、蛍光性 IP_4 センサーと蛍光性 Ca^{2+}センサーを細胞内に同時に導入して、単一細胞内で IP_4 と Ca^{2+}濃度変化を異なる波長で同時に検出することを試みた。これまでに細胞内での IP_4 と Ca^{2+}濃度変化の関連性が示唆されているが、IP_4 と Ca^{2+}の経時的な濃度変化を単一細胞内で同時に計測した例はない。二つのセンサーを細胞内に導入し、それぞれの応答を単一細胞内で経時的に計測したところ、IP_4 と Ca^{2+}は連動して産出されることが確認された。これは、情報伝達経路における IP_4 と Ca^{2+}濃度変化の連動性を直接的に示した初めての例である。

第 5 章では、情報伝達分子 IP_4 に対する、細胞内発現型の蛍光センサーを作製した。蛍光発色団として緑色蛍光タンパク質（GFP）変異体を用い、これに受容体タンパク質 PH ドメインを三次元構造情報を指標としてタンパク質工学によって融合することで、細胞内発現型蛍光センサーを作製した。この細胞内発現型蛍光センサーは、受容体タンパク質への IP_4 結合に伴う受容体のごく僅かな構造変化を GFP 蛍光発色団近傍の構造変化として伝播させることを分子設計原理としている。また、受容体タンパク質 PH ドメインの基質結合部位を改変することにより、異なる基質に対する親和性、選択性を持つ細胞内発現型の蛍光センサーへと改変することができる。細胞内発現型センサーは細胞毒性が低く、細胞内で長時間安定であるため、第 1 章、第 2 章で構築した細胞外部導入型蛍光センサーと併用することにより、複数の標的分子の細胞内挙動を計測できることが期待される。

第 6 章では、標的分子に結合する受容体タンパク質が天然に存在しない、もしくは受容体タンパク質の三次元構造情報が入手できない場合も適用可能な手法により、細胞内環境でも機能する蛍光センサーを構築した。試験管内選択法によって、標的物質アデノシン三リン酸（ATP）に結合するリボヌクレオ核酸（RNA）-ペプチド複合体を作製したのち、ATP 結合部位である RNA と蛍光分子で修飾したペプチドを共有結合することで、細胞環境内での安定性が向上した蛍光性 ATP センサーを構築した。RNA-ペプチド複合体を用いる本手法では、さまざまな標的分子に対する受容体が作製可能である。実際、蛍光性 ATP センサーとグアノシン三リン酸（GTP）に対して作製した蛍光性センサーを併用することで、細胞環境内において ATP と GTP を異なる波長で同時に検出できることを示した。

総括では、生体高分子の構造情報をもとにした細胞内情報伝達物質センサーの設計・作製法、および細胞内での応用を示した成果がまとめられている。また、本論文で開発した細胞内情報伝達物質センサー作製法の汎用性と、細胞内情報伝達機構を解明する上での細胞内における複数の情報伝達物質の同時測定の意義と展望が論じられている。

氏　名	坂口　怜子

（論文審査の結果の要旨）

本論文は、細胞内で効率の高い物質変換を達成する酵素群の機能を制御する情報伝達経路を理解するために、細胞内の情報伝達分子に対するバイオセンサーを作製し、これを用いて細胞内で複雑に連携している情報伝達分子の濃度挙動を単一細胞内でリアルタイムに検出する方法論について研究を進め、多くの有益な知見を得た結果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

１．タンパク質の転写・翻訳の制御など、細胞応答の根幹に関わる細胞内情報伝達分子であるイノシトール四リン酸（IP_4）に特異的な蛍光性センサーを開発した。天然の IP_4 受容体タンパク質の三次元構造情報をもとにして、これを化学修飾することで、IP_4 濃度変化を蛍光強度変化として検出できるセンサーを作製した。

２．蛍光性 IP_4 センサーをヒト由来細胞に導入し、生きた個別の細胞内での IP_4 濃度変化のリアルタイム計測に成功した。これは単一細胞内での IP_4 挙動の観測に関する初めての報告である。

３．蛍光性 IP_4 センサーと既存の蛍光性カルシウムセンサーを同時に細胞内に導入し、異なる波長で蛍光強度を検出することにより、単一細胞内での IP_4 濃度とカルシウムイオン濃度の変化を同時に計測することに成功した。細胞内情報伝達で連動する複数の因子を計測することにより、細胞内情報伝達の時空間的な理解へとつながることが期待できる。

４．細胞内情報伝達分子 IP_4 に対して、緑色蛍光タンパク質（GFP）変異体を蛍光発色団として用い、受容体タンパク質の基質結合に伴う微小な構造変化を GFP の発色団に伝播させる分子設計により、IP_4 濃度依存的な蛍光応答を示す細胞内で発現可能なセンサーを作製した。このセンサーはもとの受容体タンパク質の基質選択性と親和性を保持しており、試験管内にて、IP_4 濃度変化を蛍光強度変化として検出できることが示された。

５．受容体タンパク質が天然に存在しない標的分子にも適用が可能な手法で蛍光センサーを構築した。アデノシン三リン酸（ATP）と結合する RNA-ペプチド複合体を作製し、蛍光分子を導入したペプチドと受容体である RNA とを共有結合させることで、細胞内環境でも安定な蛍光性 ATP センサーの構築に成功した。

以上、本研究では、生体高分子を用いて細胞内情報伝達分子に対するバイオセンサーを作製する三つの手法の開発を行った。さらに、バイオセンサーを用いて、情報伝達物質 IP_4 の挙動を生きた単一細胞内でリアルタイムに可視化する方法論を確立した。本研究は、生体内の多段階酵素反応を制御する細胞内情報伝達分子の網羅的、統括的な検出法の開発に大きな貢献を行ったと評価する。

よって、本論文は博士（エネルギー科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 10 月 20 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。