

氏名	井上照彦
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第429号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬品作用制御システム専攻
学位論文題目	細胞内シグナル伝達及び転写反応の化学的解明と化学的モデルの構築に関する研究 (主査)
論文調査委員	教授 杉浦幸雄 教授 市川 厚 教授 川寄敏祐

### 論文内容の要旨

細胞膜の受容体に外部からの情報が伝わると、その情報は細胞内に伝達され、イノシトール-1, 4, 5-三リン酸(IP<sub>3</sub>), カルシウムイオン, 様々なタンパク質などを介して核内へと到達する。すると、核内で転写因子が活性化され遺伝子の転写が行われてmRNAが産生する。次いでそのmRNAが様々なタンパク質に翻訳されて細胞応答が起こる。

この細胞内シグナル伝達に作用する薬物の効果を化学的に明らかにするためには、*in vitro*において、ある特定のシグナル伝達に対応する転写及びmRNAの産生を検出するための化学的モデルを構築することが有効であると考えられる。また、ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)とPleckstrin Homology Domain (PH domain)を含むタンパク質との相互作用など、シグナル伝達の機構を化学的に詳しく解明することで、薬物の新たな標的を見いだせると思われる。そこで以下の研究を行った。

#### 蛍光による核酸の塩基配列特異的検出

オキサゾールイエロー(YO)は、それ自身では殆ど蛍光を発しないが、DNAにインターカレートすると蛍光強度が顕著に上昇することが知られている。そこで、YOで修飾したオリゴヌクレオチド(YO-Oligo)を合成し、特定塩基配列を持ったDNA, RNAを蛍光により検出する方法の開拓を行った。

YO-Oligoは、それと相補的な一本鎖DNAと二本鎖を形成し蛍光強度を上昇させた。二本鎖DNAを加えた場合は三本鎖を形成し、蛍光強度を上昇させた。また、非相補的な配列を持つDNAを加えた場合や三本鎖を形成しない配列を持つDNAを加えた場合は、蛍光は上昇しなかった。このことから、YO-Oligoは標的とする核酸をその配列特異的に蛍光で検出することが出来ることが示された。

YOに可視光を照射するとDNAの切断が起こることが近年報告された。そのため、YO-OligoがDNAに対してどのような影響を与えるかについて検討する必要がある。そこで、二本鎖DNAとYO-Oligoから三本鎖を形成させた後、可視光を照射したところ、スペルミンの存在下で、YO-Oligoの量を10当量、100当量にした場合にDNAの切断が起こることが明らかになった。切断の部位はYOがインターカレートしていると思われる部位と、そこから数塩基離れた場所であった。このことから、YOによるDNA切断はそれぞれSinglet OxygenとEnergy Transferによるものであると考えられる。しかしながら、切断が起こる条件と蛍光によるDNAの検出の条件は大きく異なるため蛍光検出に対しては大きな影響は無いと思われる。

これらの結果をもとに、*in vitro*におけるmRNAの産生のモニターに関しての研究を行った。C型肝炎ウイルス5'末端領域を含むプラスミドDNAを構築し、T7 RNAポリメラーゼ又はT3 RNAポリメラーゼにより転写を行いmRNAを産生させた。この転写反応をYO-Oligoの存在下で行い蛍光を経時的に測定した。その結果、相補的なmRNAの生じる転写反応においては蛍光は時間の経過とともに上昇し、その上昇は生じたmRNAの量とよく一致した。また、非相補的mRNAを生じる転写反応においては蛍光強度の上昇は見られなかった。

このことから、本実験系は転写反応のモニターに対して有効であることが示され、この方法を応用することで、転写因子

阻害物質の活性をリアルタイムに測定することが可能になると考えられる。

#### イノシトールリン酸とPH domainの相互作用の化学的解析

近年、細胞内シグナル伝達に関するタンパク質の膜への移行や、IP<sub>3</sub>生成にはPH domainが重要な役割を担っていることが明らかになり注目されている。様々なタンパク質に含まれるPH domainとイノシトールリン酸との結合性の違いによりシグナルの制御が行われている可能性がある。そこで、それらPH domainとIP<sub>3</sub>誘導体の結合を化学的手法で解析することは、PH domainを介するシグナル伝達の解明や、新規の機能性タンパク質の作用の解析に対し有効であると考えられる。

Surface plasmon resonanceによる結合測定装置であるBIAcoreを用いて経時的にイノシトールとPH domainとの結合を解析する方法の開拓のために、ビオチンで修飾したイノシトールリン酸を合成した。イノシトールの1位のリン酸からホスホジエステル結合を介してリンカーをのばし、その先にビオチンを導入したイノシトール誘導体を合成した。4位と5位にリン酸を持つ化合物をB1 IP45、持たない化合物をB1 IPと名付けた。これらの化合物をストレプトアビジンの結合したチップの上に固定し、BIAcore装置でホスホリパーゼC由来PH domain溶液を流すことで、イノシトールリン酸との相互作用を経時的に測定した。その結果、B1 IP45とPH domainとの結合は流したタンパク質の量に依存した上昇を示した。それに対して、B1 IPとPH domainとの間には有効な結合は見られなかった。

これらの結果より、本研究において合成したイノシトール誘導体の種類によって、PH domainとの結合性が異なることが示された。本実験系を用いることで、様々なPH domainとIP<sub>3</sub>との結合を解析したり、新規機能性タンパク質の結合能をin vitroにおいて化学的に解析することが出来ると思われる。

### 論文審査の結果の要旨

細胞膜上の受容体に情報物質が結合すると、その情報は細胞内を伝達され、核内で遺伝子の転写が行なわれる。その結果mRNAが産生し、それが様々なタンパク質に翻訳されて細胞応答が起こる。このシグナル伝達の経路のなかで、シグナル伝達物質とタンパク質との結合、および転写によるmRNAの産生の2つのステップに着目し、これらを検出、解析するための新方法を検討した。

#### 蛍光による核酸の塩基配列特異的検出

オキサゾールイエロー (YO) はそれ自体殆ど蛍光を発しないが、DNAにインターカレートすると蛍光強度が顕著に上昇する。YOで修飾したオリゴヌクレオチドYO-Oligoを合成し、DNA、RNAを塩基配列特異的に蛍光で検出する方法を検討した。

YO-Oligoは相補的な一本鎖DNAと結合して二本鎖を形成し蛍光強度を上昇させた。二本鎖DNAを加えるとYO-Oligoは三本鎖を形成し、蛍光強度を上昇させた。しかし非相補的な配列や三本鎖を形成しない配列のDNAでは蛍光強度は上昇しなかった。

YOは可視光の照射によりDNA切断を起こすことが近年報告されている。そこでYO-OligoによるDNAの光切断の可能性について検討したところ、スペルミンの存在下で10当量、100当量のYO-Oligoを用いた場合にDNAの切断が起こった。しかし光切断の条件と蛍光による検出の条件は大きく異なるため、蛍光検出の際にはDNA切断は殆ど起こっていないと考えられる。

C型肝炎ウイルスの5'末端領域を含むプラスミドDNAを構築し、RNAポリメラーゼにより転写を行ないmRNAを産生させた。この転写反応をYO-Oligoの存在下に行ない蛍光を測定したところ、時間の経過とともに蛍光は上昇した。蛍光の上昇は生じた相補的なmRNAの量とよく一致した。

本方法は転写反応のモニターに有効であるばかりでなく、チップ上でのDNAの光学的検出法への展開が期待される。

#### イノシトールリン酸とPHドメインとの相互作用の化学的解析

細胞内シグナル伝達に関与する多くのタンパク質はPHドメインを持っており、イノシトールリン酸と様々な強さで結合することによりシグナルの制御を行なっている可能性が示唆されている。PHドメインとイノシトール誘導体の結合を化学

的手法で解析することは、シグナル伝達の解明に対して有効と考えられる。

表面プラズモン共鳴による結合測定装置であるBIACoreを用い、イノシトールとPHドメインの結合を解析する方法を開拓するため、ビオチンで修飾したイノシトールリン酸を各種合成した。これらの化合物をストレプトアビジンの結合したチップの上に固定し、BIACore装置でPHドメイン溶液を流すことにより、PHドメインとイノシトールリン酸との相互作用を経時的に測定した。その結果、合成したイノシトール誘導体の構造によってPHドメインとの結合性が異なることが示された。

以上、本研究の結果、新たに合成したYO修飾オリゴヌクレオチドおよびビオチン修飾イノシトールリン酸は、それぞれ、核酸の塩基配列特異的検出およびPHドメインの機能解析に有効であることが示された。これらの新方法論は細胞内シグナル伝達を解析するためのチップテクノロジーへの展開が期待される。よって、審査に当たった市川教授、川寄教授そして私は、本論文が博士（薬学）の論文として価値あるものと認めた。さらに平成11年2月22日論文内容とそれに関連した口頭諮問を行なった結果、合格と認めた。