

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	定家 and 佳子
論文題目	FCCSを用いた生細胞内タンパク質間相互作用の定量		
(論文内容の要旨)			
<p>EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路は細胞の増殖、分化などの生理的な現象だけでなく、癌化や自己免疫疾患などの病的な側面にも深く関与している。シグナル伝達系は膨大な分子のネットワークによって構成されている。よって、細胞内の情報を正しく反映したモデルを構築することで、複雑なネットワークの理解および治療標的になり得る分子や方法の探索が可能になると期待されている。しかし、現状のコンピューターシミュレーションには定量性の限界がある。これは生細胞内で測定されたパラメーターの不足に起因する。そこで本研究では、蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectrometry, FCCS) を用いて生細胞内における解離定数 (<i>in vivo</i> K_d) を測定する手法を開発することで、この問題の解決を試みた。</p> <p>まず、生細胞内での FCCS 測定に適した蛍光タンパク質の組み合わせを検討した。数種類の蛍光タンパク質について比較した結果、mEGFP または HaloTag と HaloTag TMR リガンドの複合体 (HaloTag-TMR) が FCCS 解析に最も適していることが示された。次に、この蛍光タンパク質のペアを用いて FCCS の測定条件を最適化し、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路を構成する 22 種類のタンパク質のペアについて <i>in vivo</i> K_d 値を測定した。興味深いことに、本研究で定量された <i>in vivo</i> K_d 値の多くは過去に報告された <i>in vitro</i> K_d 値よりも高かった。この結果は、生細胞内では競合分子の結合が K_d 値に有意に寄与していることを示唆する。さらに、これらのパラメーターをもとに EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路のシミュレーションモデルを構築した。このシミュレーションモデルの解析を行った結果、Ras、MEK、ERK の活性化において、Shc が EGFR に複数個結合することが必要であることが示された。</p> <p>本研究で開発した方法により、<i>in vitro</i> K_d 値には反映されていなかった細胞内環境という情報を K_d 値に加味できた。また、タンパク質を精製する必要がないため、比較的簡単に、多くのタンパク質間相互作用を測定することが可能になった。この手法を使うことで、これまで圧倒的に不足していた生細胞内におけるタンパク質間相互作用の情報を定量化することができるため、シグナル伝達経路の包括的な理解において基盤となることが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

細胞内シグナル伝達系の数理モデルを構築することで、複雑なネットワークの理解および治療標的になり得る分子や方法の探索が可能になると期待されている。しかし、生細胞内で測定されたパラメーターの不足が現状のコンピューターシミュレーションの信頼性に問題を投げかけている。そこで、本研究は蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectrometry, FCCS) を用いて生細胞内における解離定数 (in vivo Kd) を測定する手法し、細胞内シグナル伝達系の数理モデル構築の基礎を作ることを目指したものである。

申請者はまず、生細胞内でのFCCS測定に適した蛍光タンパク質の組み合わせを検討し、mEGFPまたはHaloTag と HaloTag TMR リガンドの複合体 (HaloTag-TMR) が FCCS 解析に最も適していることを示した。次に、この蛍光タンパク質のペアを用いて、EGFR-Ras-ERK シグナル伝達経路を構成する 22 種類のタンパク質のペアについて in vivo Kd 値を測定した。その結果、本研究で定量された in vivo Kd 値の多くは過去に報告された in vitro Kd 値よりも有意に高く、生細胞内では競合分子の結合が Kd 値に寄与していることが示唆された。本研究で開発した方法は、生細胞内におけるタンパク質間相互作用の情報を定量化することができるため、シグナル伝達経路の包括的な理解において基盤となることが期待される。

本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されており、細胞内シグナル伝達系の定量的解析について新たな技術基盤を提供するとともに、シグナル伝達機構について新しい知見を加えている。また、その内容は申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力を十分に示すものである。以上より、本論文を博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成27年1月23日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日