

京都大学	博士（工学）	氏名	村山 秀平
論文題目	Development of solution NMR method for observation and analysis of proteins inside cells (核磁気共鳴法による細胞内タンパク質の観測及び手法開発)		
(論文内容の要旨) 本論文は、核磁気共鳴法（NMR法）により、細胞内タンパク質の観察・解析及びそのための手法を開発し、タンパク質の細胞内における構造・物性に関する知見を取得し、結果をまとめたものであって、3部から構成されている。 第1部は序論であり、生体高分子に対する構造学的研究とその手法について、主に核磁気共鳴法について論じている。また、本論文の研究対象とした、モデルタンパク質に関して、明らかになっている機能や物性と生体内における重要性についても記述している。 第2部は3つの章から構成されている。 第2部第1章では、NMR法において、高感度な核種である（フッ素）^{19}F核を用いた^{19}F NMRを<i>in-cell</i> NMR法に適用した手法開発について記述している。FKBP12タンパク質をモデルタンパク質として用い、<i>p</i>-フルオロー-<i>L</i>-フェニルアラニンにより標識を施し、<i>in-cell</i> ^{19}F NMR測定を行った。結果、細胞内における^{19}F NMRスペクトルの取得に成功した。また、細胞内NMRスペクトルと試験管内でのNMRスペクトルのシグナルの半値幅を比較することで、FKBP12のフェニルアラニン残基に関して、残基特有のダイナミクスを観察することが可能であった。またFKBP12と相互作用することが知られている薬剤（免疫抑制剤）のFK506やRapamycinを投与して、細胞内におけるFKBP12の^{19}F NMRスペクトルを測定した。それらの結果から、FKBP12と2つの薬剤との相互作用が検出可能であることが示された。また、Rapamycinを用いた場合には、<i>in-cell</i> NMRスペクトルと<i>in vitro</i>でのNMRスペクトルとでスペクトルの違いが確認された。そのため、FKBP12-Rapamycin複合体において、細胞内環境の影響を受け、相互作用様式が細胞内と試験管内で異なっている可能性が示唆された。 第2部第2章では、<i>in-cell</i> NMR法による筋萎縮性側索硬化症（ALS）関連タンパク質であるSOD1の細胞内における構造学的研究について記述している。本章では、<i>in vitro</i>において、凝集体を形成することが報告されている全長SOD1及びループを切断した変異体$\text{SOD1}^{\Delta\text{I}^{\text{V}}\Delta\text{V}^{\text{I}}\text{I}}$を実験に用いた。<i>in-cell</i> NMR法により、全長SOD1ではNMRスペクトルを取得できなかったが、変異体SOD1に関して細胞内におけるNMRスペクトルの取得に成功した。測定の結果、<i>in-cell</i> NMRスペクトルと生理的な条件である$\text{pH} 7.4$での試験管内でのNMRスペクトルが、異なっている領域が確認された。結果、これはヒスチジン残基のプロトンーションが原因であることを明らかにした。加えて、今回測定に用いているNMRチューブ内でストレスを受けた細胞では、細胞内が$\text{pH} 6.2 \pm 0.2$程度の酸性条件になっていることが明らかになった。また、測定時間中は、変異体SOD1に関して細胞内環境下でも、安定な構造を維持し、凝集を起こさないことが示された。本研究が、タンパク質のミスフォールディングや凝集が原因とされる疾患に関して、その原因タンパク質の細胞内における構造情報を取得			

京都大学	博士（工学）	氏名	村山 秀平
し、疾患メカニズム解析に寄与する一つの戦略を提案した。 第2部第3章では、細胞内におけるタンパク質の分子内ジスルフィド結合の物性に関する研究について記述している。多くのタンパク質が、分子内あるいは分子間に、ジスルフィド結合を有している。これらタンパク質のジスルフィド結合は、多くの生命現象において、重要な役割を担っていることが知られている。本研究では、溶液NMR法により、細胞内におけるタンパク質分子内ジスルフィド結合の被還元速度を定量することに成功した。実験には、分子内にジスルフィド結合を持つタンパク質C s kのS H 2ドメインを用いている。また、細胞内の主要な還元剤であるグルタチオンの生合成を阻害することで、細胞内を酸化的な条件にし、同様の実験を行った結果、非還元速度の低下が確認できた。このことから、S H 2ドメインのジスルフィド結合をプローブとして、細胞内の酸化還元状態の変化を検出できることが示された。さらに、試験管内での結果と比較することで、タンパク質分子内ジスルフィド結合をプローブとして、細胞内の酸化還元電位を評価することに成功した。得られた細胞内の酸化還元電位は、従来報告されていた値よりも、より還元的な値であった。これは、タンパク質の分子内ジスルフィド結合の物性が、細胞内環境の影響を受けることが原因と考えられる。特に、本研究の解析から、細胞内において、分子込み合い効果が大きく影響を与えていることが原因の一つであることが示唆された。 第3章は、結論であり、本論文で得られた成果について要約し、また研究の今後の発展性について記述している。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、核磁気共鳴法（NMR法）による細胞内タンパク質の観察・解析及びそのための手法開発について論じている。この研究で得られた成果は以下のとおりである。

1. NMR法において、高感度な核種であるフッ素（ ^{19}F ）核を用い、*in-cell* NMR法に適用した。結果、細胞内の観測対象タンパク質を特異的に観測できることを示した。また、細胞内の観測対象タンパク質と細胞外から投与した薬剤との相互作用を検出できることを示した。加えて、従来の二次元 ^1H - ^{15}N NMR測定を用いた *in-cell* NMR法と比較して、少なくとも4倍程度の感度の向上を実現した。
2. 細胞内で凝集することが、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因の一つと考えられているタンパク質SOD1の細胞内における構造学的研究を行っている。*in vivo*で凝集体を形成する変異体SOD1を用い、細胞内におけるNMR測定に成功した。結果、測定時間中は、細胞内環境下でも、安定に構造を保っており、凝集を起こさないことが示された。本研究により、タンパク質のミスフォールディングや凝集が原因とされる疾患に関して、その原因タンパク質の細胞内における構造情報を取得し、疾患メカニズム解析に寄与する一つの戦略を確立した。
3. 溶液NMR法により、細胞内におけるタンパク質分子内ジスルフィド結合の被還元速度を定量することに成功した。実験には、分子内にジスルフィド結合を持つタンパク質CskのSH2ドメインを用いている。また、結果から、タンパク質分子内ジスルフィド結合をプローブとして、細胞内の酸化還元電位を評価することに成功した。

以上、細胞内におけるタンパク質の観察・解析のための手法を開発し、その過程でタンパク質の細胞内における構造・物性に関する情報を取得した本論文の内容と成果は、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27年2月24日、論文内容とそれに関した事項について諮問を行った結果合格と認めた。

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。