

(論文内容の要旨)

生体内にはリン酸基を有する化合物が多種多様に存在しており、さまざまな役割を担っている。本論文は、このようなリン酸種の重要性に着目し、その機能解析を行うための分子ツールの設計、合成及び機能評価を行った結果をまとめたものであり、3 章からなっている。

第一章では、リン酸化タンパク質を電気泳動ゲル中でも選択的に蛍光検出可能な蛍光プローブ分子 **1-2Zn(II)**の開発を行った。**1-2Zn(II)**は、生体内環境においてリン酸基と選択的に結合可能な部位として二核亜鉛錯体(Dpa/Zn)構造を、蛍光部位としてアントラセンを有しており、リン酸種と選択的に結合しアントラセンの蛍光強度が増大する。**1-2Zn(II)**を用いることで、SDS-PAGE により分離した各種タンパク質の中からリン酸化タンパク質のみを蛍光検出することに成功した。その蛍光強度はタンパク質中に含まれるリン酸基数に依存し、8~9 残基のリン酸化アミノ酸を有するリン酸化 α -カゼインは、1~2 残基しかリン酸化アミノ酸を有していない脱リン酸化 α -カゼインに比べ大きな蛍光強度で検出された。このような違いは水溶液中での蛍光滴定でも確認された。リン酸化 α -カゼインとの滴定ではエキサイマー発光が見られたのに対し、脱リン酸化 α -カゼインにおいてはモノマー発光のみが観察された。**1-2Zn(II)**は実際に市販されるに至り、リン酸化タンパク質の解析に大きな寄与を果たしている。

第二章では、ATP などのポリリン酸種との結合に伴い、30 倍以上の蛍光強度増大を示すスイッチ ON 型蛍光プローブ分子の開発を行った。これまでのプローブ分子はリン酸種間での識別が困難であったが、本プローブ分子はリン酸モノエステルには応答せずポリリン酸種に対してのみ蛍光応答を示す。**1-2Zn(II)**は ATP との結合に伴いキサンテン由来の蛍光強度が 30 倍以上増大した。一方、**3-2Zn(II)**や **4-2Zn(II)**は 4.5 倍程度の蛍光強度の増加であったが、**1-2Zn(II)**より長波長での発光が実現できた。いずれのプローブ分子においても、蛍光強度の増大は肉眼で観察可能であった。このような蛍光変化は、蛍光部位であるキサンテン骨格の構造変化に起因している。

リガンド分子に亜鉛イオンが錯化すると、2つの亜鉛イオン間に架橋配位した水分子の酸素原子がキサンテン 9 位を求核攻撃し共役構造が消失することでプローブの蛍光が消光する。この亜鉛錯体型プローブ分子がポリリン酸種を認識すると、リガンド交換に伴って亜鉛イオンに架橋配位した酸素原子が解離することで共役構造が回復し蛍光が回復することが明らかとなった。これらの特性を活かし、ホスホジエステラーゼによるジアデノシン四リン酸の加水分解反応や β -1,4 ガラクトシルトランスフェラーゼによる糖転移反応のリアルタイム蛍光追跡に成功した。また、Jurkat 細胞内に存在する ATP 分泌顆粒の局在の蛍光イメージングにも成功した。

第三章では、Dpa/Zn 構造と細胞膜透過性部位を融合することで、リン酸化合物類を細胞外から細胞内へと輸送可能なキャリア分子を開発した。細胞膜透過性部位としてはピレンを用いている。一般にアニオン性物質の細胞内移行は困難なことが多いが、本キャリア分子はリン酸種の効果的な輸送を可能とした。キャリア分子の移行効率は、フルオレセインを修飾したリン酸化ペプチドの細胞内蛍光を共焦点顕微鏡観察やフローサイトメトリーにより観察することで評価した。その結果、HeLa 細胞に対し、酸性残基を多く有するようなリン酸化ペプチドやフルオレセインリン酸が $1\text{-}4\text{Zn(II)}$ により細胞内移行が促進される様子が観測された。HeLa 細胞以外の細胞種についても細胞膜移行効果は見られた。また、キャリア分子の移行効率は脂溶性部位の構造に依存し、脂溶性の低下とともに移行効率も低下することが明らかとされている。さらに、フルオレセイン二リン酸を細胞内へ輸送した実験から、細胞内に移行したリン酸種はキャリア分子から解離可能であることも示されている。低温下での移行実験やエンドソーム染色剤との共染色実験により、移行にはエンドサイトーシス経路が関与していることも示した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、リン酸基と選択的に結合可能な二核亜鉛錯体(Dpa/Zn)構造をもとに、生体内リン酸種の機能解析を行うための分子ツールを開発した成果についてまとめたものである。主な成果は次の通りである。

1. リン酸化タンパク質を選択的に蛍光検出可能な蛍光プローブ分子を確立した。Dpa/Zn 構造とアントラセンを組み合わせた蛍光プローブ分子を用いることで、SDS-PAGE に より分離した各種タンパク質の中からリン酸化タンパク質のみを蛍光検出することが可能となった。また、その蛍光強度はタンパク質中に含まれるリン酸基数に依存した。本プローブ分子は実際に市販されるに至り、リン酸化タンパク質の解析に大きな寄与を果たしている。
2. ATP などのポリリン酸種との結合に伴い、30 倍以上の蛍光強度増大を示すスイッチ ON 型蛍光プローブ分子の開発を行った。これまでに開発した蛍光プローブ分子はリン酸種間での識別が困難であったが、本プローブ分子はリン酸モノエステルには応答せずポリリン酸種に対してのみ蛍光応答する。蛍光部位にはキサンテン骨格を利用しており、認識に伴う共役構造の回復と消失が蛍光強度変化のメカニズムであることを示した。さらに、このプローブ分子を用いて酵素反応のリアルタイム蛍光追跡や Jurkat 細胞中の ATP 分泌顆粒の蛍光イメージングに成功した。
3. Dpa/Zn 構造と細胞膜透過性部位を融合することで、リン酸化化合物類を細胞外から細胞内へと移行可能なキャリア分子を開発した。一般にアニオン性物質の細胞内移行は困難なことが多いとされているが、本キャリア分子はリン酸種の効果的な輸送を可能とした。酸性残基を多く有するようなリン酸化ペプチドやフルオレセインリン酸について明確な細胞内移行が観測された。また、移行には、エンドサイトーシス経路が関与していることも示した。

本論文は、上記の通り、Dpa/Zn 構造によるリン酸基への選択的認識を利用して生体内リン酸種の機能解析を行うための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 21 年 3 月 19 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。