

氏 名	すぎもと けんじ 杉 本 健 二
学位(専攻分野)	博 士 (エネルギー科学)
学 位 記 番 号	エ ネ 博 第 65 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	エ ネ ル ギ ー 科 学 研 究 科 エ ネ ル ギ ー 社 会 ・ 環 境 科 学 専 攻
学位論文題目	イノシトールリン酸化合物に対する細胞内分子センサーの構築

(主 査)
論文調査委員 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 尾 形 幸 生 教 授 坂 志 朗

論 文 内 容 の 要 旨

イノシトールリン酸化合物は、環境汚染によって発生した活性酸素種による生体損傷を防ぐ抗活性酸素作用を持つと同時に、細胞内情報伝達を制御するセカンドメッセンジャーとして重要な機能を持つ。細胞内・細胞間のシグナル伝達解明には、イノシトールリン酸化合物をリアルタイムに検出する手法が必要であるが、現在イノシトールリン酸化合物を有効に捕捉する技術は確立されていない。本論文では、イノシトールリン酸化合物に対する分子センサー及び人工リセプターの構築を行った。主な内容は以下の通りである。

序論では、本研究の目的を示したうえで、研究の背景と本研究に関連した生体高分子を用いた機能性ドメインの分子設計法について解説し、本研究の関連について述べている。

第一章においては、イノシトール1,4,5三リン酸 (IP_3) に対する分子センサーの構築を目的として、 IP_3 に対する親和性及び選択性が高いことで知られているフォスホオリパーゼ C (PLC δ) の IP_3 認識ドメイン (PH ドメイン) を用いて、 IP_3 分子センサーの作製を行った。PH ドメインの IP_3 結合領域の残基をシステインに変換し、そのシステインを蛍光試薬で化学修飾することによって IP_3 センサーを調製したが、得られた IP_3 センサーの蛍光強度は、 IP_3 依存的に大きく変化した。またこの IP_3 センサーは、他のイノシトールリン酸化合物から IP_3 を高い選択性で識別した。

第二章においては、第一章で作製した IP_3 センサーの末端に細胞内導入可能なシグナルペプチドを融合させた改良型 IP_3 センサーを作製した。この改良型 IP_3 センサーは、種々の細胞に導入可能であり、一般的なアゴニスト刺激により誘導した細胞内 IP_3 変化をリアルタイムで検出した。本章で開発した手法は細胞内 IP_3 動態を解明する有効な方法になると期待される。

第三章では、イノシトールポリリン酸に対する結合場の構築を目的として、天然に存在する split PH ドメインモチーフを機能性ドメインとして再構築する方法論の確立を行った。現在その機能が最も明らかになっている PLC δ PH ドメインを二つのサブドメインに分割し、各サブドメインの末端にコイルドコイル形成可能なアミノ酸配列を融合させた split PH ドメインを作製した。コイルドコイルを形成することにより再構築した split PH ドメインは IP_3 に対して強く結合し、L 体の IP_3 とは結合しないという天然の PLC δ PH ドメインと同様の特性を示した。本方法論により、多様なイノシトールポリリン酸に対する柔軟な結合場の構築が可能になると期待される。

第四章では、split PH の設計方法をもとにして、split PH ドメインのうち、一方のサブユニットの基質結合領域周辺アミノ酸残基をランダム化したサブユニットライブラリーをファージディスプレイ法により作製した。ライブラリー法を組み合わせることにより多様な構造骨格を有するイノシトール誘導体に対する結合場構築が可能となり、細胞内・細胞間のシグナル伝達を解明する方法論の一つとして有力な技術になると期待される。

結語では、本論文の各章で得られた知見をまとめている。

論文審査の結果の要旨

地球環境悪化にともない種々の環境汚染物質が同定されており、これらの中には生体内で活性酸素を生成して人体に損傷を与える化合物が含まれる。生命体は、有害な活性酸素種生成による損傷を防ぐため、ビタミンやイノシトール六リン酸(IP_6)などの抗活性酸素物質を有する。また、 IP_6 及びその代謝物(イノシトール1,4,5三リン酸(IP_3)など)はセカンドメッセンジャーとして生命活動の制御に重要な役割を果たしている。これらの化合物の生命に与える影響を解明するためには、細胞内でリアルタイムに定量検出する手法の確立が必要であるが、そのような方法は未だ確立されていない。本論文では、以上の状況を鑑み、細胞内でのセカンドメッセンジャーを選択的かつリアルタイムに検出するために、機能性プロテインを用いた分子センサーの構築を行った。さらに本方法論を応用し、他のイノシトールリン酸化合物に対する結合場の構築を行った。得られた主な結果は以下のとおりである。

1) IP_3 に対する分子センサーの構築を目的として、 IP_3 に対する選択的認識能が高いことで知られているフォスホオリパーゼC($\text{PLC}\delta$)の IP_3 認識ドメイン(PHドメイン)に四種類の蛍光分子を修飾した IP_3 分子センサーの作製を行った。この IP_3 分子センサーが IP_3 と特異的に結合することによって蛍光強度が大きく変化し、他のイノシトールリン酸化合物に対して高選択性を示すセンサーであることを示した。

2) 単一細胞内 IP_3 のリアルタイム検出を目的として、1)で作製した IP_3 センサーの末端に細胞内導入可能なシグナルペプチドを融合した IP_3 バイオセンサーを作製した。この改良型 IP_3 バイオセンサーは、種々の細胞に導入することが可能であり、一般的アゴニスト刺激により誘導した細胞内 IP_3 変化をリアルタイムで検出することができた。本章で開発した手法は細胞内 IP_3 動態を解明する有効な方法になると期待される。

3) イノシトールポリリン酸の基質結合場の構築を目的として2つに分割したPHドメイン(split PHドメイン)を再構築する方法論の確立を行った。 $\text{PLC}\delta$ PHドメインを2つのサブドメインに分割し、各サブドメインの末端にコイルドコイル形成可能なアミノ酸配列を融合したsplit PHドメインを作製した。これらsplit PHドメインは再構築されることにより IP_3 に対して強く結合し、かつL体の IP_3 とは結合しないという天然の $\text{PLC}\delta$ PHドメインと同様の高選択性を示した。本方法論により、新たな機能性タンパク質ドメインの構築概念が確立されると期待される。

4) 3)におけるsplit PHの設計方法を基礎に、ファージディスプレイ法によって、split PHドメインの一方のサブユニットの基質結合領域周辺アミノ酸残基をランダム化したサブユニットライブラリーを作製した。この機能性ドメインライブラリーは、幅広い種類のセカンドメッセンジャーに対するリセプター作製を簡便化する。

以上、本論文は、エネルギー生産によって生じる環境汚染物質の生命に与える影響に関する基礎的な知見を提供するものであり、得られた成果は学術上、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(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15年2月25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。