

氏 名	中村 彰伸
学 位 の 種 類	博士（工学）
学 位 記 番 号	博第1112号
学位授与の日付	平成30年3月26日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当 課程博士
学 位 論 文 題 目	細胞核と細胞膜インナーリーフレットを標的とした局在性分子ツールの開発と応用 (Development and application of new synthetic molecular tools that target the nucleus and the inner plasma membrane in living cells)
論 文 審 査 委 員	主 査 教授 築地 真也 教授 樋口 真弘 教授 出羽 毅久 准教授 井上 圭一

論文内容の要旨

化合物を細胞内のさまざまなオルガネラや区画領域に局在化させることができれば、細胞内の局所領域で進行する分子プロセスの選択的な可視化・センシング・制御が可能になるものと期待できる。しかし、細胞内の局所領域に化合物を選択的に配置するための分子設計戦略は、細胞膜表層とミトコンドリアを除き、未だ確立されていない。

本博士論文では、化合物局在化のための分子設計戦略が確立されていない領域である、細胞核内（第二章、第三章）と細胞膜内膜（第四章）を標的として、これらの領域に任意の小分子蛍光プローブやリガンド化合物を自発的に局在化させるための汎用的な分子設計基盤の確立を行うとともに、標的領域特異的な可視化・センシング・制御技術の開発を目指した。

第二章では、DNA 結合化合物である Hoechst が核局在化タグとして利用できることを見出した。Hoechst を fluorescein (FL) , BODIPY (BDP) , tetramethylrhodamine (TMR) といった拡散型蛍光色素にモジュール的に連結することで、Hoechst 連結蛍光プローブ (hoeFL/Ac₂FL, hoeBDP, hoeTMR) を設計・合成した。Hoechst 連結蛍光プローブは、細胞培養液に添加すると、生細胞の細胞膜を透過し、核内に自発的に集積（核局在化）した。さらに Hoechst 連結蛍光プローブは、さまざまな細胞株や非固定のラット海馬スライスにお

いても明確な核局在化を示し、核蛍光染色剤として利用できることが明らかとなった。以上より、Hoechst 連結法は、核局在性蛍光プローブを開発するための汎用的な分子設計基盤になるものと考えられる。

第三章では、第二章で開発した核局在性 fluorescein (**hoeFL**) を構成する Hoechst と fluorescein が、pH 応答性を示すことに着目し、pH 依存的な両蛍光プローブの蛍光強度比変化に基づく核内選択的な pH 測定技術を開発した。本技術を用いることで、生きた HeLa 細胞の核内選択的な pH 測定に成功した。さらに、通常培養時の核内 pH が 7.4 と見積もられ、過去の報告値と一致した。本成果は、生細胞の核内 pH を領域特異的に可視化するための基盤技術となり、核内 pH の制御機構を調べるための解析ツールとしての応用が期待できる。

第四章では、細胞膜内膜に自発的に局在化するリガンド化合物の開発に取り組んだ。リガンド化合物として大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) タグの基質である trimethoprim (TMP) を選択し、細胞膜内膜局在性化合物 (myristoyl-Gly-Cys から構成される脂質化ペプチド) を連結することで、細胞膜内膜局在性 TMP リガンド (**mgcTMP**) を開発した。**mgcTMP** は、細胞に発現させた eDHFR タグと特異的に結合し、eDHFR の細胞膜内膜局在化を誘導した。さらに、eDHFR に Ras/ERK 経路の活性化因子である RasGEF を融合し、細胞膜内膜局在化を **mgcTMP** で誘導することで、RasGEF の細胞膜内膜局在化を起点とした Ras/ERK 経路の人工活性化に成功した。次に、**mgcTMP**/eDHFR と直交性を有する第 2 のタンパク質の細胞膜内膜局在移行誘導システムとして、benzylchloropyrimidine (BCP) とその結合タンパク質である SNAP タグをベースとした **mgcBCP**/SNAP システムを開発した。この **mgcBCP**/SNAP を **mgcTMP**/eDHFR と併用することで、単一細胞で 2 種類のタンパク質の iPM 局在化を独立に制御することに成功した。さらに、本システムを用いることで細胞膜内膜を起点に活性化する 2 種類のシグナル伝達経路 (Ras/ERK 経路、PI3K/Akt 経路) を任意のタイミングで独立に制御可能な細胞内シグナルの人工制御システムの開発に成功した。

以上の成果は、細胞内の核内・細胞膜内膜における分子プロセスの特異的な可視化・センシング・制御を行うための汎用的かつ強力な基盤技術になるものと期待できる。

論文審査結果の要旨

本論文は、生きた動物細胞の核内と細胞膜インナーリーフレット（内膜）に自発的に局在化する合成化合物の分子設計法を開発し、蛍光イメージングならびに細胞制御のための新しい分子ツールとして応用展開したものである。論文は以下の5章よりなる。

第1章（序論）では、本研究の背景および本論文の目的、意義、内容に関して述べている。

第2章では、合成化合物を生細胞の核内に局在化させるための Hoechst 連結法について述べている。DNA 結合化合物として知られる Hoechst 33258 を誘導化し、それを任意の蛍光色素に連結することで、ゲノム DNA への結合を介して核内に自発的に集積する核局在性蛍光色素を創製できることを実証した。また、開発した Hoechst 連結フルオレセインは、さまざまな種類の培養細胞や非固定組織スライスの細胞核を選択的に可視化でき、毒性も極めて低い、新規の緑色蛍光核染色プローブとして使用できることを実証した。

第3章では、前章で開発した Hoechst 連結フルオレセインが pH に応答して 520 nm と 460 nm の蛍光強度比を変化させるレシオ型蛍光 pH センサーとして機能することを見出した。また、この化合物を用いることで、生細胞の核内の pH を蛍光イメージングによって計測できることを実証した。

第4章では、生細胞の細胞膜内膜に自発的に局在化する合成リガンドの開発と応用について述べている。ミリスチン酸-グリシン-システインからなる脂質化ペプチドモチーフを合成小分子リガンドに連結することで、細胞膜内膜に自発的に集積する局在性リガンドを創製できることを実証した。局在性リガンドを用いると、その標的タンパク質を細胞質から細胞膜内膜上へ移行させることができ、その局在移行をトリガーとして細胞内のシグナル伝達経路を活性化できることを実証した。さらに、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素と SNAP-tag に対する局在移行誘導システムを構築し、細胞内の二種類のシグナル伝達経路（Ras/Erk 経路と PI3K/Akt 経路）をそれぞれ独立に制御可能な細胞内シグナル二重制御技術を開発した。

第5章（結言）は、総括であり、本研究で明らかとなった成果と展望をまとめている。

以上のように、本論文では、生細胞の核内と細胞膜内膜に自発的に局在化する合成化合物の設計指針を確立し、局在機能を持つ化合物を用いた新しい蛍光イメージングや生体制御アプローチを可能にした。本論文の成果は、学術雑誌3編の論文（すべて審査有）に掲載されており、学術的な価値を有すると判断される。したがって、本論文は博士（工学）の学位論文としてふさわしいものと認められる。