

サワダ シュンスケ

氏名	澤田 隼佑
学位の種類	博士 (ナノメディシン科学)
学位記番号	博第1188号
学位授与の日付	2021年3月24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	細胞内シグナル時空間制御のためのオルガネラ特異的合成分子の創製 (Development of organelle-specific synthetic molecules for spatiotemporal control of cell signaling)

論文審査委員	主査	教授	山下 啓司
		教授	築地 真也
		教授	林 秀敏
			(名古屋市立大学)

論文内容の要旨

分化や増殖といった高度な細胞機能は、細胞内のさまざまなオルガネラや膜領域で生化学反応やタンパク質間相互作用を介した分子プロセスが時空間的に進行することで精密に制御されている。したがって、合成分子をオルガネラに集積させることが出来れば、細胞機能を人為的かつオルガネラ特異的に制御・解析する強力なケミカルツールになるものと期待できる。一方で、細胞内オルガネラに持続的かつ特異的に集積する合成分子は、その具体的な設計指針自体がまだ極めて限られており、ケミカルバイオロジーの未開拓領域の一つとされている。そこで本論文では、細胞内オルガネラに持続的かつ特異的に局在化する新しい合成分子を開発し、細胞内シグナル伝達経路の時空間的な制御を可能にする基盤技術の構築を目指した。

第二章では、細胞膜インナーリーフレット/ゴルジ体に持続的に局在化する合成分子の開発と応用に取り組んだ。まず、所属研究室で以前に開発したオルガネラ局在性を示す合成リガンド (局在性リガンド) である **mgcTMP** の細胞内分解メカニズムを検証した。その結果、**mgcTMP** は、細胞内プロテアーゼによって **myristic acid-Gly-Cys (myrGC)** モチーフのアミド結合が切断されることが明らかとなった。次に、細胞内分解耐性を有する新規局在性リガンドとして、**myristic acid-D-Cys (myr^DC)** モチー

フからなる m^DcTMP を開発した。m^DcTMP は、細胞膜/ゴルジ体に持続的に局在化した。また m^DcTMP は、非天然骨格にもかかわらず細胞内のパルミトイル化依存的な機構に従って、細胞膜/ゴルジ体に局在化することが示された。この m^DcTMP を用いることによって、標的タンパク質の局在移行を誘導し、ERK 活性や脂質生産などの細胞内シグナルを持続的かつ望みのタイミングで可逆的に制御出来ることを実証した。

第三章では、ゴルジ体特異的に局在化する合成分子の開発と応用に取り組んだ。第二章で取り組んだ細胞内分解抑制の別戦略として、mgcTMP のアミド結合をメチル化(*N*-メチル化)した *N*-メチル化局在性リガンドを開発した。*N*-メチル化局在性リガンドは、細胞内分解耐性を有するだけでなく、ゴルジ体特異的に集積する特性を示した。特に、myristic acid-Gly-Cys のアミド結合 3 箇所をメチル化した (myrGC^{3Me}) モチーフからなる mgc^{3Me}TMP がゴルジ体特異的な局在性リガンドになることが明らかとなった。また mgc^{3Me}TMP は、非天然骨格にもかかわらず細胞内のパルミトイル化依存的な機構に従って、ゴルジ体特異的に局在化することが示された。さらに mgc^{3Me}TMP を用いることで、ゴルジ体膜の Ras の活性化や脂質レベルの調節といったゴルジ体特異的シグナル操作に応用できることを実証した。

第四章では、細胞膜インナーリーフレット特異的に局在化する合成分子の開発と応用に取り組んだ。いくつかの分子構造を検討した結果、細胞膜特異的な X モチーフを開発することに成功した。さらに、X モチーフは、細胞膜特異的な局在化分子として機能するだけでなく、非膜透過性ペプチドを細胞内へ導入するキャリアー分子としても応用出来ることが明らかとなった。

以上のように、本論文では、標的オルガネラに持続的かつ特異的に局在化する新しい三種類 (myr^DC, myrGC^{3Me}, X モチーフ) の合成分子を開発し、細胞内オルガネラ認識化学の分子設計指針を確立した。加えて、新たに開発した合成分子を用いて、細胞内シグナルを時空間的に制御する基盤技術を構築した。このような技術は、細胞内シグナル伝達の解析や制御だけでなく、オルガネラに局在するタンパク質を狙った特異的な薬剤や、内在性タンパク質の局在を制御して疾患を治す薬剤といった新しい創薬開拓へ応用できるものと期待される。

論文審査結果の要旨

本論文では、細胞内オルガネラに持続的かつ特異的に集積する合成分子を開発し、細胞内シグナル伝達経路の時空間的制御のための化学ツールとして応用した。論文は、以下の 5 章より構成されている。

第 1 章（緒言）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、細胞膜とゴルジ体に持続的に局在化する合成分子の開発と応用について述べている。まず、既存の局在性リガンドである *mgc*TMP の細胞内分解を解明した。次に *mgc*TMP の分子構造を改変することで細胞内分解耐性を有する新規局在性リガンドとして、*myristic acid-D-Cys* (*myr^DC*) モチーフからなる *m^Dc*TMP を開発した。*m^Dc*TMP を用いることで、ERK 活性や脂質生産などの細胞内シグナルを持続的かつ望みのタイミングで可逆的に制御することを実証した。

第 3 章では、ゴルジ体特異的に局在化する合成分子の開発と応用について述べている。細胞内分解対策として、*mgc*TMP のアミド結合をメチル化 (*N*-メチル化) した *N*-メチル化局在性リガンドを開発した。*N*-メチル化局在性リガンドは、細胞内分解耐性を有するだけでなく、ゴルジ体特異的に集積する傾向を示した。特に、*myristic acid-Gly-Cys* のアミド結合 3 箇所をメチル化した (*myrGC^{3Me}*) モチーフからなる *mgc^{3Me}*TMP がゴルジ体特異的な局在性リガンドになることが明らかとなった。*mgc^{3Me}*TMP を用いることで、ゴルジ体上の Ras の特異的な活性化や脂質レベルの調節といった細胞内シグナル操作に応用できることを実証した。

第 4 章では、細胞膜特異的に局在化する合成分子の開発と応用について述べている。さまざまな分子構造を合成し、これらの候補化合物の細胞内局在先を評価した結果、細胞膜特異的なモチーフ X を見出した。また、モチーフ X を有する局在性リガンドを用いることで、細胞膜特異的なシグナル制御に成功した。

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、標的オルガネラに持続的かつ特異的に局在化する合成分子の設計指針を構築し、細胞内シグナルを時空間的に制御する新しい化学ツールへ応用することを示した。本論文の成果は、学術誌 2 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（ナノメディシン科学）の学位論文としてふさわしいものと認められる。