



細胞外環境に適応した小さな分子イメージングツールの開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-01-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 貴久 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000160

論文内容要旨

しめい 氏名	すずき たかひさ 鈴木 貴久
学位論文題名	細胞外環境に適応した小さな分子イメージングツールの開発
<p> 蛍光タンパク質を用いたバイオイメージングは、生命科学を研究する上で重要な技法である。蛍光タンパク質は遺伝子発現のモニターや、異所的発現により、特定の細胞や組織を追跡することができるだけでなく、融合タンパク質として細胞に発現させることで、目的のタンパク質を「生きたままの細胞で」観察することができる。しかし蛍光イメージングに用いられる蛍光タンパク質は細胞質由来であるために、小胞体内腔においてフォールディングした場合には、細胞質とは異なる酸化環境に曝された結果、標識分子の構造や挙動に影響を与える場合もある。 </p> <p> そこで、従来型蛍光タンパク質が引き起こす問題点について検討し、それを解決するための新たな蛍光タンパク質群の開発と、その過程で得られたイメージング技法について研究を行い、本論文として報告する。 </p> <p> 従来型蛍光タンパク質の問題点としては、①蛍光タンパク質が有するシステイン残基の酸化がターゲット分子の酸化フォールディングを著しく阻害する、②N型糖鎖付加などの分泌系に固有で分子特性に大きな影響を与える修飾を受ける、という点が挙げられる。それらを解決するために、蛍光輝度の低下を起こす事なしにそれらの部位を排除する改変を飽和変異によって検討し、細胞外環境でも安定で高い輝度を持つ一連の蛍光タグを開発した。 </p> <p> このアプローチを発展させて光変換の特性を持つ蛍光タンパク質についても同様の改変体を二種類開発した。この改変型光変換型蛍光タンパク質は、その光変換の性質を利用して、細胞外環境での分子の非侵襲的なトラッキングを可能にただけでなく、光変換の stochastic な特性を生かして、FRET (Förster resonance energy transfer) を用いた分子間相互作用解析が可能であることを示した。 </p> <p> さらに、蛍光タンパク質の大きさ自体がタグとしての無傷性の妨げとなる場合もあるので、細胞外環境で安定な、小さな蛍光タグの開発を行った。その結果、FMN を蛍光基とする蛍光タンパクについて、ほぼ2倍の輝度と光耐性を持ち、無傷性の高い分子を開発した。この蛍光タグは従来型蛍光タンパク質より半分程度の分子量であるため、これまで困難だった小さな分子の標識に利用できると期待される。 </p>	

※日本語で記載すること。1200字以内にまとめること。

学位論文審査結果報告書

平成28年2月29日

大学院医学研究科長様

下記のとおり学位論文の審査を終了したので報告いたします。

【審査結果要旨】

氏名 鈴木貴久

所属 医学部附属生体情報伝達研究所 細胞科学研究部門

学位論文題名

細胞外環境に適応した小さな分子イメージングツールの開発

現代の生命科学において顕微鏡を用いたバイオイメージングは必須の技術である。その技術が広く用いられるようになった要因として生体由来の蛍光タンパク質の発見と遺伝子改変蛍光タンパク質の開発が進んだことが挙げられる。本研究は、新たな遺伝子改変蛍光タンパク質を開発することにより、バイオイメージングで利用できるツールを生み出すことを目指したものである。

本論文では、(1) 酸化的環境下に適応する蛍光タンパク質群の開発、(2) 光変換型蛍光タンパク質群の改変と応用、(3) 小さな蛍光タンパク質タグの改変、という三種類の試みが述べられている。(1) については GFP family の中でも最も優れた蛍光を放つ SGFP2 に対してシステイン基を別のアミノ酸に置換してジスルフィド結合による蛍光の消失を防ぐことを狙ったシステインフリー-SGFP2 (cfSGFP2)を開発した。cfSGFP2 は、従来では十分な蛍光強度が得られなかった小胞体内腔に存在するタンパク質のイメージングに有効であった。また同様の試みとしてシステインを無くすことにより糖鎖修飾を受けない改変型 TagRFP、改変型 mKate2 の開発に成功した。(2) については、レーザー光照射により GFP 様の波長特性から RFP 様の波長特性に変化する蛍光タンパク質 mKikGR および Dendra2 に対してシステイン置換により酸化的環境においても安定な蛍光を発する蛍光プローブの開発に成功し、分泌系

タンパク質のトラフィックの研究に有用であることが示された。(3)については、蛍光タンパク質によるタグ付けを行う際に、なるべく低分子量の蛍光タンパク質が望ましいが、植物由来の phiLOV2.1 に着目し、さらに遺伝子改変により分子輝度を改善した蛍光プローブの作製に成功した。また、(1)～(3)を通じて、各改変蛍光タンパク質についての詳細な蛍光特性についても報告している。

本研究において開発された蛍光タンパク群は、今後のバイオサイエンスにおいて非常に重要なツールになりうるもので、それらを粘り強く見つけて行った研究姿勢は賞賛に値する。本研究の内容は、すでに査読付き英文誌 PLOS-ONE に掲載されており、本年2月9日に開催された学位審査会においても、研究内容が明確に示され、質疑応答においても的確に質問に対する回答を行なった。これらのことから本研究は本学医学博士授与に値するものと判断できる。

論文審査委員	主査	挾間 章博
	副査	植村 武文
	副査	富川 直樹