

論文審査の結果の要旨

氏名 李 喬婧

本論文は、二分割ルシフェラーゼフラグメントの再構成技術を用いて、細胞融合を定量的に評価する技術開発と、その技術を応用したケミカルライブラリースクリーニングの成果に関する論文である。

本論文は全4章からなる。第1章では骨格筋の筋形成において、サテライト細胞から筋芽細胞に分化し、細胞融合により多核の筋管が形成され、最終的に筋繊維となることを説明している。この筋形成を促進する薬剤は、がん悪液質の治療や、老化・栄養不良による筋力低下の治療に役立つことが期待されることから、そのリード化合物探索の研究意義を述べている。次に既存の細胞融合評価法が、蛍光顕微鏡による細胞観察の半定量評価法に基づいていることを説明している。具体的には、細胞核を有機色素でまたミオシタンパク質を抗体染色することで、多核化した細胞の割合を定量評価する。この技術は染色に多段の操作が必要となること、顕微鏡下で1細胞ずつ多核化を判断するため、細胞計測数に限度があり定量性に劣ることを問題点として指摘している。そのため既存技術では、数千種類以上のケミカルライブラリーを用いたスクリーニングはほぼ不可能であり、新たな技術開発が必要であることを述べている。

第2章でははじめに本研究の目的が、細胞融合の程度を生物発光により定量的に評価する新たな技術開発であることを述べ、筋芽細胞株 (C2C12) をモデルとした細胞融合評価法の原理について解説している。ホタル由来のルシフェラーゼを二分割したフラグメントに、プロテインスプライシング反応を起こすインテイン (DnaEn、DnaEc) を連結した融合タンパク質を作製する。各々の融合タンパク質を安定に発現する C2C12 細胞株を樹立する (N-Cell、C-Cell とよぶ)。この細胞単独ではルシフェラーゼ発光が観測されないが、細胞融合が起こると各融合タンパク質が同一細胞のサイトゾルに局在し、スプライシング反応によりルシフェラーゼが再構成する。従って、細胞融合の程度がルシフェラーゼ発光により観察される。この原理を検証するために、N-Cell と C-Cell を共培養し細胞融合を起こさせ、ルシフェラーゼ全長がスプライシング反応により形成されていることを Western blotting により立証している。またそのルシフェラーゼ発光は、96 穴マイクロプレートリーダーで測定可能な感度を有しており、未反応の細胞に対して

10 倍以上のシグナル変化があることを実証している。さらに、既存の技術である蛍光顕微鏡による観察結果と相互相関を調べ、細胞融合の程度がルシフェラーゼ発光値と比例関係にあることを示している。代表的な C2C12 細胞融合の阻害剤である TNF- α 、および促進剤である IGF-1 を用いて、ルシフェラーゼ発光によりハイスループットなアッセイ系が構築できたことを結論づけている。開発した手法は、およそ 10^4 個の細胞が融合した割合を化学発光シグナルとして定量評価する新たな技術であり、大きな波及効果が期待される成果である。

第 3 章では、第 2 章で開発した技術を用いて、リポジショニングのための既存薬理活性化化合物ライブラリー (Prestwick Chemical Library) 1,191 種類をスクリーニングした結果を述べている。同一化合物について 2 回のスクリーニングを行った結果、2 種類の化合物 Imanitib と Doxazosin が、C2C12 細胞融合を顕著に促進することを見出している。各々の化合物について細胞融合促進の効果を濃度依存的に調べており、およそ数 μM の濃度で最大効果を発揮することが実証されている。これらの化合物の標的分子や作用メカニズムが既に明らかであることから、C2C12 細胞融合への促進効果について、その分子メカニズムについて考察している。一連の成果は、ケミカルライブラリーから新たなヒット化合物を獲得するための優れたスクリーニング技術であることを実証しており、よりスケールの大きな化合物ライブラリー実験への展開が今後期待される成果である。

第 4 章は、本研究で開発した細胞融合評価系の既存技術に対する優位点、ならびに大規模スクリーニングを行うにあたっての課題、そして C2C12 細胞以外の細胞融合研究への応用展開について述べている。本論文において、2 分割ルシフェラーゼの再構成技術を用いた細胞融合評価系は様々な波及効果が期待できる技術であり、また化合物ライブラリーによるスクリーニングから 2 種類の細胞融合促進剤を同定した点で学術的に意義深い研究成果である。

なお本論文は、吉村英哲氏、小宮真希氏、田尻健氏 (京都大学)、上杉志成氏 (京都大学)、畑裕氏 (東京医科歯科大学) との共同研究の成果をまとめたものであるが、論文提出者が主体的に実験やデータ解析を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。