

様々な細胞のはたらきは、細胞内で生起するシグナル伝達によって複雑に制御されている。細胞内シグナル伝達を外部から意のままに操作できるようになれば、細胞機能の理解はもとより、疾患の治療等にも大きく貢献すると期待される。本研究では、こうした観点から、細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質を外部からの刺激で操作するための技術の開発を目的としている。兪改改氏は、様々な細胞機能の制御において重要な役割を果たす三量体 GTP 結合タンパク質（三量体 G タンパク質）の光操作技術を開発すると共に、抗体様分子である Affibody を用いて新しいコンセプトの細胞操作技術を開発している。

本論文は 4 つの章で構成されている。第 1 章では、本論文の緒言として、生命現象の操作技術の発展の歴史を説明すると共に、当該技術の開発研究の現状について分析を行っている。その中で、三量体 G タンパク質を取り上げ、細胞内シグナル伝達における重要性を説明した上で、本研究で三量体 G タンパク質を光で操作する技術を開発する目的を明確にしている。さらに、進化分子工学的アプローチを導入することにより、既存の細胞操作技術の問題点を克服し、新しい細胞操作技術を開発する構想について説明している。

第 2 章では、三量体 G タンパク質のうち、特に細胞内のカルシウムイオンの制御に重要なエフェクタータンパク質（ホスホリパーゼ C β ）を活性化する α サブユニット（Gaq）に着目し、その光操作技術を開発している。当該技術の開発戦略として、青色光で制御できる光スイッチタンパク質（Magnet システム）を用いて、細胞質から細胞膜に Gaq を輸送することにより、青色光依存的な Gaq の活性化を実現している。開発した技術が、生理的な濃度範囲でカルシウムイオンの動態を操作できることを実証すると共に、光照射の時間的・空間的パターンを制御することにより、細胞内のカルシウムイオンの動態を自在に時空間操作できることを示している。本章では、青色光での操作に加えて、赤色光で制御できる光スイッチタンパク質（PhyB-PIF6 システム）を用いて、赤色光による Gaq の光操作技術を開発している。さらに、当該技術で用いる Gaq を、環状アデノシンリン酸（cAMP）の制御に重要なエフェクタータンパク質（アデニル酸シクラーゼ）を活性化する α サブユニット（Gas）で置換することにより、Gas の活性を赤色光で操作する技術を開発できることを示している。三量体 G タンパク質の α サブユニットの活性を青色光と赤色光で光操作する技術をそれぞれ開発すると共に、当該技術が三量体 G タンパク質の様々な α サブユニットに応用可能な一般性を有していることを示した点は高く評価できる。

第 3 章では、進化分子工学的アプローチに基づいて、細胞機能を操作する技術を開発している。この目的のために、リボソームディスプレイ法を用いて、抗体様分子である Affibody の変異体ライブラリーのスクリーニングを行い、細菌が有する光受容体（バクテリオフィトクロム：DrBphP）の光受容ドメインに結合する Affibody（Affi24）を開発している。Affi24 の結合特性を調べる中で、Affi24 が DrBphP の C 末端に位置するヒスチジンキナーゼ（HK）ドメインの有無を識別できることを見出している。HK ドメインを保持する DrBphP と HK ドメインを失った DrBphP に対する Affi24 の結合選択性に関する発見か

ら着想を得て、化合物添加や光刺激、温度変化等に応答して HK ドメインを欠失するように TEV プロテアーゼによる切断配列を導入した DrBphP の変異体 (TEV-inducible DrBphP : TI-DrBphP) を設計し、外部刺激 (化合物, 光, 温度等) に応答して複数のタンパク質を同時に操作できる分子システムを創案している. この分子システムは, 細胞膜や核へのタンパク質の輸送を外部刺激で操作する実験系で検証されると共に, ネクロトーシスと呼ばれる様式の細胞死の制御において重要な役割を果たすタンパク質 (Mixed lineage kinase domain-like protein : MLKL) を用いて細胞死を操作する技術へと応用されている. 進化分子工学的アプローチに基づいて開発した Affi24 を用いて, 従来の技術では困難だった, 複数のタンパク質による複雑な細胞操作を実現した点は高く評価できる.

第 4 章では, 本論文の結言として, 各章の一連の結果について総括するとともに, 本研究の成果と今後の展望を整理している.

以上のように, 兪改改氏は, 様々な細胞機能の制御において重要な役割を果たす三量体 G タンパク質の光操作技術を開発すると共に, Affibody を用いて新しいコンセプトに基づく細胞操作を実現した. 本研究の成果は, 生命現象の操作技術に新たな進歩をもたらすものとして高く評価できる. 従って, 本審査委員会は, 本論文が博士 (学術) の学位を授与するのにふさわしいものと認定する.