

論文審査の結果の要旨

氏名 那須 雄介

本論文は、光学顕微鏡を用いた新規細胞死分析法の開発に関する研究結果をまとめたものである。

本論文は全4章からなる。第1章では、生物研究に用いられる顕微鏡法について概説したのち、顕微鏡法に基づく細胞死研究についてその現状と問題点を述べている。細胞死は様々な疾患発症との関連が指摘されており、生きた動物個体中で細胞死を観察する *in vivo* イメージング法は、細胞死のメカニズム解明に必須である。しかしながら既存の細胞死分析法では *in vivo* イメージングが困難であった。また細胞死の惹起に決定的に重要な役割を果たすタンパク質凝集体は、細胞死研究において非常に高い関心が持たれているが、その凝集体の構造を細胞内で定量的に分析する方法が存在しなかった。以上の背景を説明した上で、本研究の目的が細胞死の *in vivo* イメージングを可能にする分析法の開発であること、及びタンパク質凝集体の *in situ* 定量分析法の開発であることを述べ、その開発意義を説明している。

第2章は、生きた動物個体内で細胞死を検出する新規分析法の開発について記述している。はじめに、蛍光タンパク質の自発的再構成と呼ばれる現象を利用することで、細胞死が起きた時にその細胞が蛍光を発する本分析法の原理を述べている。原理を検証するために、精製したタンパク質プローブを試験管内で反応させ、蛍光が自発的に回復することを実証した。さらにタンパク質プローブを培養細胞に発現させて、細胞死を誘導するUV刺激を加えたところ、死細胞のみから蛍光シグナルが得られることを示した。最後に、タンパク質プローブを安定発現するゼブラフィッシュを作成した。UVを照射することにより細胞死を誘導すると、生きたゼブラフィッシュ個体中の死細胞を蛍光イメージングにより可視化できることを実証した。動物個体内の細胞死の初期のシグナルを蛍光シグナルとして高感度に捉えることができるため、細胞死メカニズム解明の新たな技術として大きな波及効果が期待できる成果である。

第3章は、細胞死を誘導するタンパク質凝集体の新規 *in situ* 定量分析法の開発に関して記述している。本研究で利用する photo-activated localization microscopy (PALM) 法とよばれる技術は、細胞内の蛍光分子を一分子ずつ検出し、その局在を極めて高い位置精度で決定することができる。また光学限界以下の解像度で、標的タンパク質の分子数を定量的に解析することが可能である。本論文では、細胞死シグナルを惹起する Bak タンパク質のミトコンドリア膜上で

の凝集体の解析結果について述べている。蛍光タンパク質を連結した Bak を培養細胞に発現させ、UV 刺激の一定時間後に PALM 法により凝集体観察を行った。Bak タンパク質凝集体の半径、分子数、分子密度に関して定量的な解析を行い、異なる半径の凝集体でも分子密度が一様であることを明らかにした。これらの結果は、細胞死誘導には Bak 凝集体の密度が重要であることを示唆しており学術的意義が非常に大きいと判断される。

最終章である第 4 章では、本研究で開発された細胞死分析法の学術的意義、既存の分析法に対する利点、今後応用可能な研究対象、および将来的な研究展望について記述されており、研究全体を総括している。

なお本論文は、浅岡洋一氏、生江美佐子氏、仁科博史氏、吉村英哲氏、Alexander Benke 氏、荒川聡子氏、吉田剛氏、河村玄気氏、Suliana Manley 氏、清水重臣氏との共同研究の成果をまとめたものであるが、論文提出者が主体となって実験およびデータ解析を行ったものであり、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。