

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図的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光で自在に操作するための技術開発を目的としている。現在、光遺伝学(オプトジェネティクス)の分野では、植物や藻類、菌類が有する光受容体を利用して、タンパク質を光操作しようとする試みが始まっている。論文提出者が所属する研究室では、先行研究において、アカパンカビが有する光受容体(Vivid)に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施すことにより、新しい光スイッチタンパク質(Magnetシステム)を開発してきた。Magnetシステムはサイズが小さく、高い反応選択性と速い切り替え速度という優れた特長を有する一方で、当該システムを構成するタンパク質間の親和性の低さという課題が残されていた。古谷氏は本研究において、光スイッチタンパク質の自己集合という新たなアイデアを導入することにより、親和性に関するMagnetシステムの課題を克服すると共に、光操作の高効率化を実現している。

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、オプトジェネティクスの歴史と現在までに開発されてきたオプトジェネティクス技術の概要を説明している。その中でMagnetシステムを取り上げて、多角的なプロテインエンジニアリングを通じて光操作の高度化を実現した優れたオプトジェネティクス技術として解説している。同時に、Magnetシステムに残された親和性に関する課題を指摘し、これを解決すべく本研究の目的を明確にしている。

第2章では、Magnetシステムを直列に複数連結してオリゴマー化することにより親和性の問題を解決しようとする、親和性は向上するものの、分子量が大きくなるため当該システムの細胞内での発現量が著しく低下してしまうことを明らかにしている。この結果に対して古谷氏は、直列オリゴマー化というプロテインエンジニアリングにおける既存のアプローチでは親和性と発現量がトレードオフの関係となってしまう、Magnetシステムの高度化には繋がらないとの分析を与えている。これを受けて、親和性と発現量のトレードオフを克服するために、自己集合ドメインをMagnetシステムに連結する新しいアプローチについて検討を行なっている。これは、分子量は小さく維持しつつ、Magnetシステムを自己集合させて見かけの親和性を飛躍的に向上させるという優れたアイデアである。自己集合ドメインとして機能しうる様々なタンパク質やドメインの評価を行い、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKII $\alpha$ )のC末端ドメイン(CAD)がMagnetシステムを自己集合させるドメインとして最適であることを見出している。加えて、CADを連結したMagnetシステム(CAD-Magnetシステム)は、細胞内で高い発現と親和性を示すことを実証している。さらに、CAD-Magnetシステムが従来のMagnetシステムと同様に、非常に速いキネティクスを有することを示している。このような特長を有するCAD-Magnetシステムにより、細胞質から細胞膜へのタンパク質の輸送を非常に高い効率で光操作できることを実証している。

第3章では、前章において開発したCAD-Magnetシステムを用いて、細胞膜の動きを制御するシグナル伝達の光操作を実証している。この目的のために、低分子量GTP結合タンパク質(Rac1)の活性化因子であるTiam1のDH/PHドメインをCAD-Magnetシステムに連結して用いている。当

該システムを細胞に発現させて光照射を施すと、細胞膜にラメリポディアが形成されたり、膜ラフリングが生起するなど、Rac1 の活性化に特徴的な現象が観察された。これは、CAD-Magnet システムが細胞内で Rac1 を光操作できることを示している。さらに、従来の Magnet システムを用いた場合に比べて、はるかに大きなラメリポディアが観察されたことから、CAD-Magnet システムが極めて効率的な光操作を実現できることが分かった。さらに古谷氏は、このシステムを用いて細胞膜の一部でのみ Rac1 を活性化して細胞膜の微細な動きを 3 次元的にタイムラプスイメージングすることにより、Rac1 によって引き起こされる細胞膜の動きの素過程を初めて明らかにした。

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共に、オプトジェネティクスのための既存技術との比較を通じて、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、古谷氏は、自己集合型の新しい光スイッチタンパク質として CAD-Magnet システムを開発すると共に、当該技術を細胞膜の動きを制御する素過程の理解に応用した。本研究の成果は、オプトジェネティクスに新たな進歩をもたらすものとして高く評価できる。

以上の点から、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。