別紙２

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名　河野 風雲

様々な細胞機能は細胞内シグナル伝達によって制御されている．この細胞内シグナル伝達を意のままにコントロールできるようになれば，細胞機能の理解や疾患の治療に繋がると期待されている．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生体分子を光で自由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，生体分子の機能を光操作しようとする試みが始まっている．しかし，そこで用いられている天然の光受容体は，反応効率や選択性，反応速度等の点において，問題を抱えていることが指摘されている．本研究では，こうした問題点を克服した新しい技術を開発することが当該分野の次なる課題と捉え，天然の光受容体に対してプロテインエンジニアリングを施すことにより，実用性と汎用性に優れた光スイッチタンパク質を開発している．

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，細胞内シグナル伝達に関わる生体分子を操作することの重要性や，天然の光受容体を用いた光操作技術の背景とその課題について説明し，本研究の目的を明確にしている．

第 2 章では，まず，様々な光受容体の比較に基づいて，アカパンカビの光受容体（Vivid）の優位性を説明すると共に，天然の当該光受容体が克服すべき点を明確にしている．その上で，Vivid の機能を計測すべく，分割ルシフェラーゼを用いた生物発光アッセイ系を構築している．このアッセイ系は，Vivid の変異体のキャラクタリゼーションを著しく簡便にし，本開発研究を成功させる一因となっている．次に，光照射依存的に形成される Vivid のホモ二量体界面にアミノ酸変異を導入することにより，静電相互作用に基づいて，当該光受容体の二量体形成を制御できることを示している．この検討に基づいて，天然の Vivid が直面する選択性に関する問題を克服し，光照射依存的に選択的なヘテロ二量体を形成する Vivid の変異体の開発に成功している．さらに，河野氏は，この Vivid 変異体の反応速度が，天然の Vivid と同様に，極めて遅いことを次なる課題と捉え，当該変異体の補因子周辺のアミノ酸に対して更なる変異導入を行っている．その結果，反応速度のみならず，二量体形成効率も向上した変異体の開発に成功している．このように開発された独創的な光スイッチタンパク質は“Magnet”と名付けられている．　河野氏は，Magnet が細胞内シグナル伝達に関わる様々な生体分子の光操作を実現することを示し，Magnet の実用性と汎用性を実証している．

第 3 章では，第 2 章でも取り組んだ光受容体の反応速度の問題に対して，新しい視点に立った開発研究が行われている．河野氏は，光受容体の機能の ON/OFF が，その補因子が示す蛍光の OFF/ON と相関することから着想を得て，補因子の蛍光イメージングに基づいて，反応速度が変化した変異体を網羅的に探索するハイスループットスクリーニング系を構築している．特に，シロイヌナズナの光受容体（Phototropin1）の光受容ドメイン（AsLOV2）を例として，本スクリーニング系の検証を行うと共に，野生型よりも反応速度が劇的に高速化した AsLOV2 の変異体を単離してみせ，本法の有用性を実証している．本スクリーニ

ング系は極めて一般性が高く, AsLOV2 のみならず, 様々な光受容体の反応速度の向上や, 第 2 章で開発した Magnet の更なる高速化を実現することが期待され，非常に意義深い成果と言える.

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課題を整理している.

以上のように，河野氏は，細胞内シグナル伝達の光操作を実現する，実用性と汎用性に優れた光スイッチタンパク質“Magnet”を開発すると共に，光受容体の反応速度を劇的に向上させるための新しい方法論を創案した．本研究の成果は，既存技術の抱える問題点を克服し，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.

したがって，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.