

論文審査の結果の要旨

氏名 楊 靈芝

本論文は、生きた細胞内ではたらくホスファチジルイノシトール3リン酸(PIP3)を可視化および定量的に解析するための生物発光プローブ分子の開発と、外部光により生細胞内のPIP3を人工的に産生させる技術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、PIP3に関する序論として、それらの分子の構造的特徴、生理機能、および既存の検出法について述べている。生細胞内のPIP3を検出することは、それらが担う多様な生理機能を理解する上で極めて重要である。これまでに生細胞内のPIP3分析法として、蛍光タンパク質を利用したプローブが開発されている。しかし蛍光プローブは、励起光が細胞にダメージを与えるため長時間の連続的な観察には適さなかった。さらに、PIP3産生は創薬において重要な指標となるが、化合物ライブラリースクリーニングを行う上で、分子の自家蛍光は常に検出の妨害となる。これら従来法の問題点を指摘した上で、本研究の目的が生きた細胞内におけるPIP3の生物発光分析法と光操作技術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、生細胞内のPIP3を半定量解析する生物発光プローブの開発に関して記述している。このプローブは、コメツキムシ由来のルシフェラーゼとその変異体を利用し、細胞膜上でのPIP3産生にともない発光するように設計されている。プローブを発現した培養細胞を用いて、アゴニスト刺激にともなう細胞内でのPIP3の濃度変化を、発光値の強度変化を指標として96穴マイクロプレート上で定量分析できることを実証した。また、プローブ発現細胞をアゴニスト刺激した時に、細胞膜上で産生されるPIP3を、発光顕微鏡によりイメージングすることに成功している。開発したプローブの特徴は、PIP3産生と分解を可逆的に発光検出できる点にある。また、検出原理は他の脂質情報伝達分子にも応用可能であり、プローブ分子の新たな設計原理として大変意義ある研究である。

第3章は、外部光によりPIP3を細胞膜上に産生させる技術開発に関して記述している。この技術では、植物由来の光受容体と動物由来のPIP3産生酵素とを融合した構造体からなる。光刺激にともないPIP3産生酵素が細胞膜上に局在変化すると、細胞膜上でPIP2からPIP3が産生される原理になっている。この融

合タンパク質を発現させた生細胞の解析では、青色光刺激により細胞膜上で一過的な PIP3 産生が起こることを実証した。また、PIP3 は細胞走化性と深く関わっている。上記融合タンパク質を発現させ細胞の局所に青色光照射すると、細胞は光照射方向に移動することを実証した。本結果は、光により PIP3 を人工的に産生できること、そして光により細胞機能が制御できることを証明しており、その学術的意義は非常に大きい。

最終章である第 4 章では、本研究で開発された PIP3 生物発光プローブと PIP3 の光操作技術の学術的意義、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、那須雄介、服部満、吉村英哲、菅野憲との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、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。

最終試験の結果の要旨

氏名 楊 靈芝

成績 合 格

本委員会は、論文提出者に対し平成26年1月29日、学位論文の内容および関連事項について、口述試験を行った。

その結果、論文提出者は、化学特に分析化学について博士（理学）の学位を受けるにふさわしい十分な学識を持つものと認め、審査委員全員により合格と判定した。