

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 瀧川 健司

本研究では、生体分子を可視化する蛍光プローブを効率的に開発するプラットフォームの構築を目的とした。そのために、短期間で高性能なハイブリッド型プローブを開発する技術 HyFlnD (Hybrid-type Fluorescence Indicator Development) の構築を行い、HyFlnD で開発したハイブリッド型プローブの蛍光イメージングへの応用可能性について検証し、下記の結果を得ている。

1. ハイブリッド型プローブのダイナミックレンジと標的分子に対する親和性を左右する蛍光色素の標識位置を迅速かつ網羅的に評価することで蛍光イメージングに最適なハイブリッド型プローブを選抜する技術、HyFlnD を構築した。
2. 2 種類の分子認識タンパク質 (グルコース結合タンパク質、アラビノース結合タンパク質) と 2 種類の蛍光色素 (Oregon Green、Alexa Fluoro 488) を原料として、HyFlnD を用いて 618 種類のグルコースプローブ候補と 614 種類のアラビノースプローブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、20% 以上のダイナミックレンジを有する 18 種類のグルコース蛍光プローブと 17 種類アラビノース蛍光プローブを取得することに成功した。また、取得した両蛍光プローブのリガンドに対する親和性について評価した結果、いずれにおいても解離定数が μM から mM まで広い範囲に分布していることが明らかとなった。
3. グルタミン酸結合タンパク質と 4 種類の蛍光色素 (Oregon Green、Alexa Fluoro 488、Alexa Fluor 350、Cy3) を原料として、HyFlnD を用いて 1,080 種類のグルタミン酸プローブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、2,000% 以上のダイナミックレンジを示し、グルタミン酸に対する親和性が適度な (解離定数: $41.6 \mu\text{M}$) グルタミン酸蛍光プローブ eEOS の開発に成功した。
4. eEOS を培養海馬神経細胞の細胞膜上に固定化し、1 発のフィールド電気刺激

を与えた所、シナプス前終末マーカー (VGLUT1) の免疫染色像と一致する箇所では電気刺激と同期した蛍光シグナルがスポット状に観察された。この結果から、eEOS はシナプス前終末から開口放出されるグルタミン酸を単一シナプスレベルで可視化できることが示された。また、PMA 刺激によって蛍光シグナルが増強したことから、eEOS はグルタミン酸放出の増強効果を検出できることが示された。さらに、低頻度もしくは高頻度のフィールド電気刺激を与えた所、個々のシナプス前終末から放出されるグルタミン酸の放出量は刺激頻度に応じて不均一に変動し得ることが明らかとなった。

5. ATP 結合タンパク質と 3 種類の蛍光色素 (Oregon Green, Alexa Fluoro 488, Cy3) を原料として、HyFlnD を用いて 402 種類の ATP プロブ候補の作製及び性能評価を行った。その結果、ATP に選択的な反応を示す蛍光プロブ ATPOS の開発に成功した。
6. ATPOS と EOS を培養アストロサイトの細胞膜上に固定化し、メカニカル刺激を与えた所、刺激直後に刺激箇所付近から両蛍光プロブのシグナル上昇が起こり、各シグナルが同心円状に広がっていく様子が観察された。この結果から、HyFlnD によって開発した蛍光プロブがマルチカラー同時イメージングに応用可能であることが示された。
7. タンパク質 X 線結晶構造情報と HyFlnD の結果を基に、多変量ロジスティック回帰分析を行った所、以下の結果を得た。1. タンパク質の構造変化が大きい蛍光色素の標識位置ほど蛍光強度変化が起こりやすい。2. トリプトファンと蛍光色素の標識位置が近接しているほど蛍光強度変化が起こりやすい。以上の結果は、ハイブリッド型プロブの蛍光強度変化の分子メカニズムの解明に迫る重要な知見である。

以上、本論文では、HyFlnD が生体分子を可視化する蛍光プロブを効率的に開発するプラットフォームとなり得ることを示した。本研究は細胞機能に関与する様々な生体分子の可視化解析の実現に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。