

Title	細胞内蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発
Author(s)	森川, 高光
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.18910/52234
DOI	10.18910/52234
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

〔 題 名 〕 細胞内蛋白質濃度感受性蛍光蛋白質の開発

学位申請者 森川 高光

細胞内は、蛋白質や核酸などの分子によって非常に混雑した環境である。細胞内の蛋白質濃度は、350 mg/mlと見積もられており、この高密度状態は分子混雑と呼ばれている。高蛋白質濃度下では、蛋白質のフォールディングや酵素の活性が変化することが報告されている。近年では、細胞内での蛋白質の立体構造を調べるin-cell NMRにより、細胞内においては蛋白質がより安定であることも報告されており、混雑さは、蛋白質の状態、ひいては細胞の状態を決める重要な要素の一つであると考えられている。

分子混雑は、FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching)法や、FCS (fluorescent correlation spectroscopy)法など蛍光蛋白質や色素などのプローブの拡散係数を用いて見積もられている。しかしながら、細胞内には、細胞骨格などの構造体も存在するため、プローブが細胞内の分子や構造体と相互作用してしまい、拡散係数に影響してしまう。そのため、拡散係数は、細胞内の混雑さを完全に反映しているとは言えない。細胞内の分子混雑を評価するためには、拡散係数のみならず、細胞内の分子の密度、つまりは濃度を同時に測定する必要がある。本研究では、蛋白質の濃度を検出するプローブの開発し、それにより細胞内蛋白質濃度を計測し、従来の拡散係数による評価方法と比較した。

プローブには、蛍光蛋白質を応用する。様々な発光色の蛍光蛋白質が開発されているが、その中でも黄色蛍光蛋白質 (YFP) は、溶液中の蛋白質濃度に伴い蛍光強度が減少することが分かった。本研究では、さらにYFPの蛋白質濃度に対する感受性を増加させるため、YFPの145番目のチロシン残基の位置にグリシン残基を挿入した変異体 (YFP1G) を作製した。結晶構造解析によれば、グリシン残基の挿入により蛍光蛋白質の発光団付近に水分子が配置されていることが分かった。結果として、YFP1Gは溶液内の疎水性に強く反応するようになり、YFPに比べ蛋白質濃度に対する感受性が向上されていた。YFP1Gと蛋白質濃度に感受性を持たない青色蛍光蛋白質 (CFP) とを融合させたFRET (Foster resonance energy transfer) プローブを作成した (GimRET, Glycine-inserted mutant FRET probe)。このFRETプローブは、蛋白質濃度に応じてCFPとYFP1Gの蛍光強度比が変化する。GimRETの有用性は、細胞分裂過程、蛋白質合成/分解、および、細胞体積変化による蛋白質濃度変化の検出を行うことで、確かめられた。

我々は、GimRETを用いて細胞内における蛋白質濃度と蛋白質拡散との相関を調べた。GimRETの示す蛋白質濃度とFRAPにより見積もられた拡散係数には確かに相関が観られたものの、その相関は、細胞核内と細胞質内では異なり、拡散係数が分子混雑を一意に定義していないことが示された。我々は、GimRETを用いた蛋白質濃度計測とFRAPによる拡散係数計測との同時計測を、新しい細胞内分子混雑の評価方法として提案する。

以上のように、YFPに疎水感受性を持たせることで、細胞内蛋白質濃度感受性FRETプローブGimRETの開発に成功した。さらにGimRETによる蛋白質濃度計測とFRAPによる拡散係数計測を組み合わせることで、分子混雑を正しく評価する方法の提案に至った。本研究課題が提案する方法は、古くから議論されてきながらも解明されてこなかった『分子混雑』に関して、新しい知見をもたらすと期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森川 高光)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	特任教授 柳田敏雄
	副 査	教授 難波啓一
	副 査	教授 八木健
	副 査	教授 月田早智子
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>森川君が研究題材とした、細胞内における分子の混雑さは、生命現象において重要な要素の一つであり、それに関わる研究は古くから成されている。しかしながら、分子混雑を物理的に一意に定義できるパラメータは無い。従来は、あるプローブとされる粒子の拡散運動を以って、分子混雑を定義してきた。森川君の研究は、分子が混雑している状況そのもの、すなわち、細胞内にある分子の濃度を計測することに焦点を当てている。これまで細胞内の分子濃度を単細胞精度で計測できる技術は存在しておらず、当該研究の重要性は高い。森川君は、分子生物学的手法を用い、溶液の蛋白質濃度の高低により蛍光が変化する蛍光蛋白質の作製に成功した。この点に関しては、学会賞の獲得等の実績から見ても評価できる。しかし残念なことに、アミノ酸挿入により蛍光蛋白質が疎水性感受性を持ったメカニズムについては調べ切れていない。</p> <p>総評として、森川君は、生命現象に重要な方法を開発し、その方法は新たな知見を生み出す可能性を示している。課題は残されているものの、本研究は、博士学位論文として評価できるものであり、学位を授与するに値すると認める。</p>		