

Title	マルチカラー高光度発光タンパク質の開発と生命科学 研究への応用
Author(s)	鈴木, 和志
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61783">https://doi.org/10.18910/61783</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 鈴木 和 志 )

## 論文題名

マルチカラー高光度発光タンパク質の開発と生命科学研究への応用

## 論文内容の要旨

**序論 蛍光イメージング技術の問題点**

化学発光は、蛍光で問題になる自家蛍光による計測ノイズや観察対象へ与える光毒性を克服できるため、次世代のバイオイメージング技術として有望である。しかしながら、十分な高光度と豊富な波長変異体の両方を兼ね備えた化学発光タンパク質ファミリーが報告されていないため、複数のタンパク質動態、生命現象を高速かつ同時に可視化することは困難である。そこで、本研究では可視光全域におよぶ高光度化学発光タンパク質波長変異体を開発し、それらが生命科学研究に資するかを調査した。

**第一章 高光度化学発光タンパク質波長変異体の開発**

化学発光タンパク質NLucと種々の蛍光タンパク質(FP)をハイブリッドし、NLucからFPへのFRETを介して、発光波長を長波長シフトさせる戦略が有効であると考えた。NLucとアクセプターFPを繋ぐリンカーの長さ、アミノ酸配列の最適化およびFPをNLucの内部に挿入することでFRET効率を高められることを見出し、可視光全域におよぶ5色の波長変異体enhanced Nano-lantern (eNL)を開発した。

**第二章 高光度化学発光タンパク質波長変異体の特性評価**

eNLの*in vitro*および哺乳細胞中での化学発光計測を行い、緑色・水色波長変異体がNLucを上回る発光高度を有し、少数のタンパク質からなる複合体を可視化できることを示した。最後に、NLucだけでは困難な複数の細胞内構造体の可視化を試み、5種類の構造体を同時に可視化することに成功した。

**第三章 ルシフェラーゼ再構成法による機能性指示薬の開発**

eNL緑色波長変異体をバックボーンとしてルシフェラーゼ再構成法による化学発光性Ca<sup>2+</sup>指示薬の開発を行った。その結果、Ca<sup>2+</sup>依存的にシグナルが500%変化する化学発光性Ca<sup>2+</sup>指示薬GeNL(Ca<sup>2+</sup>)の開発に成功した。

**第四章 化学発光性カルシウムイオン指示薬の物性評価**

蛍光性Ca<sup>2+</sup>指示薬との性能比較を行い、GeNL(Ca<sup>2+</sup>)がシグナル-ノイズ比(S/N)および長時間イメージングに伴う光毒性という観点において、優位性を有することを示した。最後に、iPS細胞由来心筋細胞における周期的なCa<sup>2+</sup>振動を長時間可視化することに成功した。

以上のように、本研究で開発したマルチカラー高光度発光タンパク質は、今後多くの生命科学研究に適用されうるものであり、蛍光タンパク質ではなし得なかった生命現象の解明に活用されることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 鈴木 和志 )			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	永井 健治
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	藤山 和仁

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、化学発光タンパク質から蛍光タンパク質への FRET を活用して、可視光全域におよぶ高光度化学発光タンパク質波長変異体の開発を行った論文である。化学発光タンパク質を用いたバイオイメージング技術は蛍光イメージングに対して潜在的な優位性を有している。しかしながら、十分な高光度と豊富な波長変異体の両方を兼ね備えた化学発光タンパク質ファミリーが未だ報告されていないため、マルチチャンネル計測や高速な生命現象の観察は限定されていた。本論文で開発した5色の高光度な化学発光タンパク質波長変異体は、生命現象をより忠実かつ多面的に計測することが可能にし、生命科学研究への幅広い応用が期待される。

第一章では、酵素活性の高い化学発光タンパク質と種々の蛍光タンパク質の融合タンパク質を構築し、それぞれを結合するリンカーの長さやアミノ酸配列を検討することで、水、緑、黄緑、橙、赤色化学発光タンパク質の波長変異体 enhanced Nano-lantern (eNL)の開発について詳述されている。

第二章では、第一章で開発した波長変異体を活かして細胞内の5種類の構造体(ミトコンドリア、小胞体、核、核小体、細胞膜)を同時に可視化し、マルチチャンネル計測を実証した。蛍光観察で問題となる励起光を一切用いることなく、こうした観察を行うことができたことは、細胞をより生理的な状態でかつ多面的に計測できる事を意味し、本研究分野における先駆的な貢献であると認められる。また、マルチチャンネル計測としての切り口以外でも、それぞれの高光度な波長変異体を用いて、これまで困難であった少数のタンパク質からなる複合体や単一分子の観察を可能にし、化学発光観察の高感度化という点においても非常に意義のある成果であると考えられる。

第三章では、一章で開発した高光度化学発光タンパク質を構造的基盤にして、細胞の重要なセカンドメッセンジャーの一つであり、高速に変動していることが知られている  $\text{Ca}^{2+}$ の化学発光性指示薬の開発を行っている。タンパク質のタグだけではなく、生理活性物質にまで観測対象を拡張し機能性指示薬を開発できた点は本研究の汎用性の高さを示している。

第四章では、三章で開発した化学発光性  $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬の性能を、汎用されてきた蛍光性  $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬と比較することで評価している。その結果、有機蛍光色素  $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬に対して、シグナル/ノイズ比および長時間観察という観点において、優位性を持つことを見出している。最後に、iPS細胞由来心筋細胞における周期的な  $\text{Ca}^{2+}$ 振動を長時間可視化し、効果的な創薬スクリーニングに応用できる可能性を実験的に示している。

今後の展望としては、本技術は蛍光イメージングでは困難な光遺伝学との併用を可能にする点で比類なき先進性があり、神経のコントロールと活動計測を同時に行うことで高次神経活動のメカニズムに迫ることが期待される。

これらの理由により、本論文を博士論文として価値あるものと認める。