

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	細胞内酸化還元状態变化の可視化
Title(English)	
著者(和文)	杉浦一徳
Author(English)	Kazunori Sugiura
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9921号, 授与年月日:2015年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:久堀 徹,若林 憲一,一瀬 宏,村上 聡,田口 英樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9921号, Conferred date:2015/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	杉浦 一徳	
論文審査員	氏 名	職 名	氏 名	職 名
	主査 久堀 徹	教授	田口 英樹	教授
	若林 憲一	准教授		
	一瀬 宏	教授		
	村上 聡	教授		

本論文は「細胞内酸化還元状態変化の可視化」と題し、5章で構成されている。

第1章「序論」では、生体内における酸化還元状態の恒常性維持、蛍光、蛍光タンパク質といった本論文の根幹をなす事柄について概説し、現在までに作成されてきた様々な蛍光タンパク質センサーを紹介している。さらに、既存の酸化還元応答蛍光タンパク質やその応用例についてまとめ、その上で本研究において作成すべき蛍光タンパク質に要求される特性を明確に示している。

第2章「新規酸化還元応答蛍光タンパク質の設計」では、第1章の知見を踏まえ、実際に新規の酸化還元応答タンパク質を作成する方法を検討している。GFPとは異なる発色団を持つ蛍光タンパク質Siriusに円順列変異を加え、システインを導入することで、酸化還元状態の変化に伴い蛍光強度の変化する変異体を取得することに成功したことを報告している。また、Siriusにシステインを導入し、147番目のシステインのC末端側にアミノ酸を導入することで酸化還元に強く応答する変異体を取得したと述べている。さらに、この変異体の146番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することで、より大きく蛍光強度の変化する変異体が作成可能であることを示している。

第3章「酸化還元応答蛍光タンパク質Oba-Q」では、第2章で考案した方法を用いて、実際にSiriusをベースとした酸化還元応答蛍光タンパク質を作成した結果を述べている。作成したタンパク質は、いずれも酸化時に蛍光が消光することから、Oxidation balance sensed quenching protein (Oba-Q)と名づけたと述べている。さらに、Oba-Qは、酸化還元状態変化に伴い蛍光強度が大きく変化し、顕微鏡下での観察に適した特性を示したこと、さらに、このタンパク質を用いてHeLa細胞内の酸化還元変化を測定したことを報告している。また、CFPをベースとした変異体も同様の方法で作成し、第2章で考案した方法は他のGFP変異体に対しても有効であることを示している。そして、新たな変異導入を検討し、酸化還元電位が生体内で利用するのに適した酸化還元応答蛍光タンパク質を作成できたと述べている。

第4章「蛍光スクリーニングシステムの開発」では、蛍光タンパク質の遺伝子に部位特異的ランダム変異導入を行い、優れた酸化還元応答性を示す変異体を簡便に選抜する実験系を構築したことを述べている。蛍光タンパク質を発現している大腸菌に励起光を照射し、蛍光強度を画像として記録する蛍光プレートリーダーシステムを自作し、これを利用することで短時間で多くの蛍光タンパク質変異体を選抜することが可能となったと述べている。また、新たにBFP、YFPを用いた酸化還元応答蛍光タンパク質変異体も作成し、予想したとおり酸化還元応答を示す変異体を取得することに成功したと報告している。

第5章「新規酸化還元応答タンパク質の特性確認」では、第4章で選抜した新規の酸化還元応答蛍光タンパク質の詳細な蛍光特性を調べた結果を述べている。YFP変異体において、CFPやSiriusをベースとしたものとは異なる分子機構によって酸化還元に応じて蛍光が変化している可能性が高いことを明らかにしている。また、新規の変異体の中に生体内での使用に耐える十分に低い中間酸化還元電位を持つものが複数確認されたことを報告している。

第6章「総括・今後の展望」では、第1章から第5章の内容をまとめ、本研究の今後の展望について述べている。

以上を要するに、生体内の酸化還元電位の変化をモニター可能な新規酸化還元応答蛍光タンパク質の作成方法の開発と、得られたタンパク質の実用性を明らかにしたものであり、レドックス生化学の研究に新たなブレークスルーを提示した点において理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認められる。