

別紙1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	乙 第	号
------	---	-----	---

氏 名 渡部 拓

論 文 題 目 蛍光タンパク質の特徴を活用したタンパク質間
相互作用調整剤評価系の開発

論文審査担当者

主 査 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
教授 博士（理学） 東山 哲也
委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教授 博士（理学） 五島 剛太
委 員 名古屋大学遺伝子実験施設 教授 博士（農学） 多田 安臣

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

申請者の論文は生命現象の重要な分子機構であるタンパク質間相互作用 (Protein-Protein Interaction; PPI) を理解するため、また、タンパク質間相互作用調整剤を取得するために、既存のタンパク質間相互作用の解析手法の問題点を克服する技術の開発、およびその実証を目的とした。当該論文では、2つのアプローチにより、上記課題の解決を試みた。

■アプローチ①タンパク質断片補完法を用いた新規ハイスループットスクリーニング系の構築

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)を利用し、操作が簡便であり、ハイスループットなインビトロアッセイ系が構築された。従来 BiFC 法を用いてタンパク質間相互作用調整剤を取得するのは困難であったが、バックグラウンドシグナルの低い monomeric Kusabira Green (mKG)を用いることで、アッセイを可能としている。更に、GATEWAY システムと小麦胚芽インビトロ翻訳系を組み合わせることで、操作が簡便であり、ハイスループットなスクリーニング系が構築された。申請者は該アッセイ系を用いて、がん関連の PPI 標的 3 種についてそれぞれ 123,599 サンプルのスクリーニングを実施し、ヒット化合物を同定した。よって、構築したスクリーニング系有用性が十分示されたと言える。

■アプローチ②液相転移を利用した PPI 可視化法の開発

申請者は細胞内に普遍的に存在する構造である liquid phase droplet をモデルとして、従来の PPI 検出系とは全く異なる原理の PPI 検出法 (Fluoppi) を開発した。本系について、従来の検出系が有する課題を解消し得る点、即ち可逆性、実時間応答性、創薬への応用可能性 (定量性・高いダイナミックレンジ) が示され、シグナル伝達の可視化や、PPI 阻害剤の評価への適用が可能であることが示された。また、Fluoppi におけるリードアウト (蛍光輝点) は liquid phase droplet 様の挙動を示す結果も得られている。更に、申請者は蛍光タンパク質の特性を活用する事で、該検出系を細胞内で PPI のキネティクスを解析する photo convertible Fluoppi や、単一コンストラクトでのホモダイマー検出を可能とする homo Fluoppi へ展開した。Homo Fluoppi を用いた ERK2 ホモダイマーの解析では、ERK2 ホモダイマー形成が振動する現象を見出している。

本論文は、BiFC の利用によるハイスループットスクリーニング系の構築と PPI 阻害薬の同定、および、新しい作動原理を用いた PPI 検出系の開発、という 2つのアプローチから、既存の PPI 検出法が有する様々な課題を解決しており、生命現象の重要な分子機構である PPI を理解する為の優れた手法が構築されたと言える。また、開発の過程で、Fluoppi で形成される liquid phase droplet の性質を含め、PPI の新たな知見も得られた。

以上の理由により、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。