

氏名	二見 翠
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第2912号
学位授与の日付	平成17年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Development of an effective protein transduction technology for mammalian cells (動物細胞に対する効率的蛋白質導入技術の開発)
論文審査委員	教授 山田 秀徳 教授 齋藤 清機 教授 宍戸 昌彦

学位論文内容の要旨

培地から蛋白質を直接細胞内に導入する方法は、遺伝子導入法とともに、蛋白質を動物細胞内で機能させる方法としての分子生物学的な基盤技術となる。蛋白質導入技術は、蛋白質の機能解析から細胞内シグナル制御、更に発展させれば細胞増殖や分化などの細胞機能の人為的制御を可能にすると考えられる。しかし、現在一般に用いられている蛋白質導入法(TATペプチドやpoly-Argなどの塩基性ペプチドを蛋白質に付加して導入する方法)では、導入する蛋白質の種類によっては導入効果が発揮されないものもあり、その原因の一つは導入蛋白質の細胞に対する親和性の低さにあると考えられる。

本論文は、天然に存在するカチオン性蛋白質、ヒト好酸球由来リボヌクレアーゼ ECP が生きた細胞によく取り込まれるという現象から蛋白質細胞導入におけるカチオン性の重要性に気づき、その観点から蛋白質カチオン化による画期的蛋白質細胞導入法の開発を行った結果をまとめたものである。第1章では化学修飾によりカチオン性の異なる RNase を作成することでカチオン性と細胞導入効率の相関を証明し、第2章では蛋白質カチオン化法の改良として高密度カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン (PEI) を用いた蛋白質機能への影響の低い「PEI カチオン化法」を開発した。PEI カチオン化法による蛋白質導入の応用例として、抗体導入による細胞骨格アクチンフィラメントのイメージングを第3章に、 β -catenin 蛋白質導入による Wnt/ β -catenin 経路活性化を第4章に記載した。さらに簡便な蛋白質細胞内導入法として、生化学の分野で広く用いられている相互作用 (ストレプトアビジン-ビオチン複合体および IgG-Protein G 複合体) を利用して非共有結合により蛋白質を PEI 化する「PEI キャリア法」の開発結果を (5章) にまとめた。

論文審査結果の要旨

任意の蛋白質を生きた細胞内で機能させるためには、その蛋白質をコードする遺伝子を細胞に導入し、細胞自身にその蛋白質を作らせる方法（遺伝子導入法）と、蛋白質を外から細胞に取り込ませる方法（蛋白質導入法）がある。遺伝子導入法は蛋白質を機能させ続ける場合には有効であるが、ある期間だけ一時的に機能させたい場合には蛋白質そのものを導入する方が望ましい。現在までにいくつかの蛋白質細胞内導入法が報告されているが、すべての細胞に高効率で蛋白質を取り込ませる方法がなかった。申請者は、天然に存在するカチオン性蛋白質、ヒト好酸球由来リボヌクレアーゼ（ECP）が細胞によく取り込まれるという現象から蛋白質導入におけるカチオン性の重要性に気付き、その観点からカチオン化による画期的な蛋白質細胞内導入法を開発した。本学位論文はこれらの研究成果をまとめたものである。申請者は第 1 章で、化学修飾でカチオン化することにより無毒な RNase を毒素蛋白質に変換できること、また調製した一連のカチオン性の異なる RNase と細胞毒性の関係から、蛋白質のカチオン性が細胞内導入効率を決定していることを証明した。第 2 章では効率的な蛋白質のカチオン化法として高密度カチオン性ポリマーであるポリエチレンイミン（PEI）で修飾する事を検討し、蛋白質機能への影響が低い「PEI カチオン化蛋白質細胞内導入法」を開発した。さらに申請者は開発した PEI カチオン化蛋白質細胞内導入法の応用も検討し、抗体導入による細胞骨格アクチンフィラメントのイメージングを第 3 章で、また β -catenin の導入による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の活性化を第 4 章でまとめている。第 5 章ではさらに、より簡便な蛋白質細胞内導入法として、生化学分野で広く用いられている相互作用（ストレプトアビジン-ビオチン、および IgG-Protein G 相互作用）を利用して非共有結合により蛋白質を PEI 化する「PEI キャリア法」の開発結果が述べられている。

以上のように本研究は、細胞の種類を問わず常に高効率で蛋白質を自由に導入する方法を開発し、さらにこの技術が生きた細胞の中の蛋白質の局在を可視化したり、細胞内シグナル伝達系を制御するのに有効であることを立証したものであり、将来の応用展開が大いに期待される。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として価値があると認める。