

京都大学	博士 (工学)	氏名	藤本 和也
論文題目	マイクロ・ナノトラック内におけるキネシンおよびダイニンを用いた分子輸送と計測に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、モータタンパク質であるキネシンおよびダイニンと細胞骨格である微小管を生体外において利用し、分子輸送や運動の詳細な計測に向けて、マイクロ・ナノトラック構造を利用した方法を提案するとともに、実験と解析からその有効性を示したものであり、6章からなっている。</p> <p>第1章は緒論であり、研究の背景および目的、提案する研究手法および論文全体の構成について述べている。マイクロメートルスケールの構造内で流体試料を扱う Micro Total Analysis Systems (μTAS) の分野において、現在より微細化がさらに進みデバイスがサブマイクロメートルスケールになった場合、圧力駆動による送流や分子操作が困難であるという課題が顕在化する。この課題を解決するため、キネシンおよびダイニンと微小管を生体外において工学的に利用しサブマイクロメートルスケールのチャンネル内で物質輸送を行うことを提案している。モータタンパク質は化学エネルギーを運動エネルギーに変換するが、工学的な応用のためにはその運動を制御することが必要であり、これまでに報告された微細加工技術を利用して微小管の運動方向を制御する方法や、化学的な手法で速度を制御する技術など研究の背景をまとめ研究の背景としている。さらに、現状の微小管-キネシン・ダイニンの利用法における課題として、1種類のモータタンパク質のみを利用しているために複数種類の分子の輸送が行えないこと、またモータタンパク質による能動的輸送を定量的に評価できずその優位性を示されていないこと等を指摘している。そこで、これらの課題の解決を目的として、本論文の第2章から第5章で述べられている具体的な研究内容について概説し、それら相互の関係と論文全体の構成について述べている。</p> <p>第2章では、キネシンおよびダイニンを同時に利用して、微小管のプラス端方向およびマイナス端方向への双方向の分子輸送系を提案している。微小管上を互いに逆方向へと運動するキネシンおよびダイニンを利用して、双方向の輸送を実現するためにはビーズアッセイ系が適するが、これまでキネシンとダイニンを同時に利用して双方向に輸送した例は知られていない。本論文では、ナノトラック内で微小管を運動させることで極性と方向が規定された微小管アレイを作製するとともに、結合性を持つ分子系を設計し、キネシンおよびダイニンに付加して輸送している。微小管アレイ上で輸送された分子が近接する際に、Glutathione S-transferase (GST)-glutathione (GSH)あるいはアビジン-ビオチン結合が特異的に起こっていることを示し、提案した分子輸送系の有効性を示している。</p> <p>第3章では、第2章において提案した方法を応用し、圧力駆動流や拡散の影響を抑制した上で、微小管-キネシン・ダイニン系の能動的な輸送による分子操作を評価することを目的として、高さ1 μm以下のサブマイクロチャンネルを自在に開閉できる流体デバイスを提案している。サブマイクロチャンネル内におけるタンパク質のアッセイでは、複数回の溶液導入によるタンパク質の凝縮や失活が問題となる。そこで、3層の Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) からなるバルブ構造を利用することで、チャンネルを動的に形成できるデバイスを考案し、微小管やキネシンを導入した後にサブマイクロ</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	藤本 和也
<p>チャンネル（以下チャンネル）を形成し、能動輸送を評価できる実験系を実現している。作製したチャンネル内において、モータタンパク質の運動による能動的な輸送と拡散および圧力送液による輸送を比較することで、前者が支配的となることを示している。</p> <p>第4章では、第3章で設計したデバイスを利用し、ビーズアッセイ系においても拡散と圧力送液による輸送に比べて、キネシンの能動輸送が支配的であることを実証している。微小管をアレイ化しチャンネル内に固定した後、チャンネルに設けたバルブとしてのPDMS薄膜を駆動することにより、チャンネルの配置を動的に変化させことで、キネシンによる量子ドットの輸送を実現している。ここでは、量子ドットを輸送対象物質と見なし、個々の量子ドットの運動軌跡を評価することで、チャンネル内においてもキネシンの運動性が保たれていることを示している。また、キネシンによる量子ドットの能動的な輸送が、10 μm 離れた場所で数 nM 程度の分子濃度差を有する場における拡散と同程度であることを示し、提案した方法が μTAS で求められる分子輸送への応用において有用であることを示している。</p> <p>第5章では、前章までに提案しその有効性を示したサブマイクロメートルオーダーのチャンネル内での物質輸送における、計測の問題の一つとして、より詳細な一分子観察のための計測に関する課題を解決する方法を提案している。すなわち、キネシンの運動ステップと Adenosine triphosphate (ATP) の加水分解サイクルについて同時に一分子観察を行うことを目的として、計測系の構築を提案しその有効性に関して考察している。従来、全反射照明による一分子蛍光観察が用いられているが、全反射照明を用いる方法では蛍光 ATP 濃度を 100nM 以下にする必要があり、これは細胞内における ATP 濃度と比較して低いという問題があった。そこで、より高濃度の ATP を用いて一分子計測するため、幅 100nm 程度のトラック構造をもつ Linear Zero Mode Waveguide (LZMW) を用いる計測系を提案し、LZMW の電磁場特性に関する数値解析、ファブリケーションプロセスの確立および蛍光観察系の構築について考察している。数値解析の結果からは、蛍光 ATP が励起される体積を抑制し、かつ、キネシンの位置推定を数 nm の精度で行うために、幅 150 nm 程度の LZMW が適していることを示している。また設計した寸法の LZMW を安定して作製できるファブリケーションプロセスを考案している。蛍光観察系に関しては、同時蛍光観察を行うための蛍光色素の選定とそれに対応した光学系を構築し、キネシンのシングルステップとそれに応じた ATP 一分子のキネシンへの結合を同時に解析できることを示し考案した方法の有効性を示している。</p> <p>第6章は結論であり、本論における研究の結果とその意義について論じるとともに、今後に向けた展望について述べている。</p>			

氏名	藤本 和也
----	-------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、モータタンパク質であるキネシンとダイニンの工学的な応用に向けて、マイクロ・ナノトラックを利用して分子スケールでの輸送およびその計測について従来知られていなかった方法を提案し、実験から示されたその有効性についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. キネシンとダイニンにそれぞれ異なる分子を付加して極性を揃えた微小管アレイ上で輸送し、それらの分子の結合を観察することでキネシンおよびダイニンによる双方向性の分子輸送系を確立した。
2. タンパク質アッセイ中に動的にサブマイクロチャンネルを形成できる独自のデバイスを開発し、チャンネル内における微小管およびキネシンの運動アッセイを確立した。また、微小管およびキネシンの運動観察からモータタンパク質による能動的な分子の輸送と、拡散や圧力送液による輸送について定量的に比較し、サブマイクロスケールのチャンネル内では能動輸送が支配的にかつ効率よく分子輸送を実現することを実証した。
3. 従来の全反射蛍光観察法では困難であったキネシンのステップ運動と ATP 一分子の結合・解離を同時に観察することを目標として、LZMW を用いた新規な観察系の構築を提案した。数値計算によるデバイス寸法の最適化、ファブリケーションプロセスの確立とともに、全反射蛍光観察の結果からキネシンのステップと ATP の結合解離の同時観察が可能であることを示した。

本論文は、キネシンおよびダイニンを用いた輸送とその計測についてマイクロ・ナノトラックを利用した新たな方法を提案するとともに、キネシンおよびダイニンの工学的応用の実現に寄与する技術を実験的に示したものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。