

(続紙 1)

京都大学	博士 (工学)	氏名	磯崎 直人
論文題目	微小管の電気的および機械的特性の制御による高精度な微小管分離システムの開発		
<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細胞骨格である微小管の運動系を生体外で再構築し、高次機能を有する分子システムを創製することを目指して、キネシン上を運動する微小管の運動方向を制御する方法を提案するとともに、高精度な微小管分離システムを実証したものであり、5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。特に、微細な流路構造内で分子操作を行う Micro Total Analysis Systems (μTAS) において、流路構造の微細化に伴って比表面積が増大するため圧力損失が増大し、従来の圧力送液による溶液駆動が困難になることを指摘している。この問題を解決するため、自律的に分子輸送が可能なキネシンと微小管の系を生体外で再構築し、分子輸送のための駆動力として用いることを提案している。その方法として、キネシンを固定した基板上で微小管を運動させる、グライディングアッセイとよばれる手法の必要性を述べるとともに、微小管に分子を修飾する技術と微小管の運動方向を制御する技術が必要であることを指摘し、これまでに提案されている方法として、特異結合を利用した微小管への分子修飾技術、およびマイクロ流路構造や外場を用いた微小管の運動方向制御技術について研究の現状をまとめている。また、従来の技術では微小管の運動を単一の方向にしか制御できないことが、μTAS で求められるマルチタスクの実現に向けた障壁になっていることを指摘し、本論文が解決する技術的課題を明らかにしている。第1章の最後に、課題の解決に向けて本論文の第2章から第4章で述べられている具体的な研究課題について概説し、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、微小管の電気的特性を改変することにより、微小管の運動方向を制御する方法を提案している。まず、電荷の異なる分子を修飾した微小管を作製し、電気泳動移動度をレーザードップラー法により測定している。その結果、修飾分子の電荷が増加するに従って、微小管の電気泳動移動度が増加することを示している。続いて、作製した微小管を一様電界中において運動させることにより、微小管が電気泳動移動度に応じた方向に輸送されることを示している。これにより、一様電界中で微小管を複数の方向に輸送する技術を確立している。また、修飾分子の有効電荷の情報が得られれば、微小管の電気泳動移動度を算出し、一様電界中における運動軌跡を予測できることも示している。これにより、時間や費用のかかる予備アッセイ実験を必要とせず、所望の分子システムに最適なマイクロ流体デバイスを設計するための方法論を確立している。</p> <p>第3章では、微小管の電気的および機械的特性を改変することにより、マイクロ流体デバイス内で微小管を高精度で分離する方法を提案している。微小管は生体内でそ</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	磯崎 直人
<p>の役割に応じて曲げ剛性を変化させることが知られているが、曲げ剛性の変化を及ぼす要因や、曲げ剛性の値に関する統一的な見解はなかった。本論文では、まず、曲げ剛性に影響を与える微小管に結合するタンパク質の有無や微小管の長さおよび重合時の条件を明らかにしている。微小管の曲げ剛性は、微小管の一部を基板上に固定し、固定されていない部位の熱揺らぎによる変形を追跡することで、微小管の平均曲げエネルギーを測定し、熱エネルギーが全て微小管の曲げエネルギーに変換されるものとして方程式を解くことで、算出している。その結果、タウタンパク質の結合の有無や微小管の長さは微小管の曲げ剛性に影響を与えないこと、一方で重合の際に用いるヌクレオチドの種類および伸長速度が微小管の曲げ剛性決定に支配的な要因であることを見出している。さらに、曲げ剛性を利用したマイクロ流体デバイス内での微小管の分離のため、曲げ剛性と電気泳動移動度を改変した微小管を電界中で運動させ、微小管が曲げ剛性と電気泳動移動度に応じた方向に輸送されることを示している。また、微小管が描いた運動軌跡をもとに、分離に最適な電界強度およびデバイスの構造を決定し、一様電界を印加したマイクロ流体デバイス内において作製した微小管を運動させることで、曲げ剛性の改変により二種類の微小管を約 60%の精度で分離できることを示している。さらに、曲げ剛性と電気泳動移動度双方を改変することにより、分離精度を約 80%に向上させられることを示し、提案した評価方法およびその応用による微小管の運動方向制御方法の有効性を示している。</p> <p>第 4 章では、微小管の曲げ剛性を第 3 章で提案した方法よりも、より正確に測定する新たな方法を確立し、それを用いて微小管の重合時の伸長速度が曲げ剛性に与える影響を評価している。論文中では、まず、熱揺らぎによる形状変化を再現した微小管の仮想モデルに対し、位置座標の決定精度が 1 nm、10 nm、100 nm の場合について曲げ剛性を評価し、微小管の位置決定精度が低下するに応じて曲げ剛性の測定誤差が増加することを示し、曲げ剛性の正確な測定のためには、ナノメートルレベルの精度で微小管の位置決定を行う必要があることを見出している。次に、伸長速度の異なる微小管を作製し、ナノメートルレベルの精度で微小管位置を決定し曲げ剛性を測定することで、伸長速度がある閾値を超えると、微小管の曲げ剛性が急激に低下することを新たに見出している。さらに、従来報告されてきた曲げ剛性の測定結果のばらつきが、画像解析における微小管の位置決定精度と伸長速度のばらつきに由来することを明らかにしている。</p> <p>第 5 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>			

(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細胞骨格である微小管の工学的な応用に向けて、キネシン上を運動する微小管の運動方向を制御する方法を提案するとともに、微小管の機械的特性を精度良く評価する方法を提案しその有効性を示すとともに、曲げ剛性と電気泳動移動度を利用した新たな分離方法に関する研究成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 電荷の異なる荷電分子を修飾することにより電気泳動移動度を改変した微小管を一様電界中で運動させ、運動方向を評価した。これにより、微小管を電気泳動移動度に応じて複数の方向に輸送できることを示した。
2. 重合条件の違いにより曲げ剛性を改変した微小管を作製し、一様電界中での運動方向を評価することで、曲げ剛性に依りて複数の方向に微小管を輸送できることを示した。また、得られた微小管の運動軌跡を基に微小管分離のためのマイクロ流体デバイスを設計および作製し、曲げ剛性の差異により二種類の微小管を約60%の精度で分離できることを実証した。さらに、電気泳動移動度の改変を組み合わせることで、分離精度を約80%まで向上させられることを示し、提案した方法が高精度な微小管分離システムを実現することを示した。
3. 微小管の曲げ剛性を正確に測定するためには、ナノメートルレベルの精度で微小管の位置決定を行う必要があることを示した。また、微小管の伸長速度が曲げ剛性を決定する重要な条件であることを示し、これまで報告されてきた曲げ剛性の測定結果がばらついていた原因を解明した。

本論文は、キネシンと微小管を用いた分子輸送系について、微小管の特性に着目した新たな運動制御方法を提案するとともに、キネシンと微小管の工学的な応用例を実証したものであり、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29年3月17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、京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に変えてその内容を要約したものとすることを認める。