

京都大学	博士（工 学）	氏名	五十嵐 龍治
論文題目	In vivo selective detection of highly polarized spin using MR (高偏極スピンの磁気共鳴を用いた選択的生体内計測)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、磁気共鳴法、特にNMRおよびMR Iによる生体内計測は、核スピンの極めて低いボルツマン偏極に制約されるため、感度の低さや計測可能な双極子間距離の短さなどに弱点があるという現状を踏まえ、より高い偏極率を有するスピンを利用することでこれらの弱点を克服し、生体内の対象を選択計測するための磁気共鳴の方法論について研究した成果についてまとめたものであって、5章からなっている。 第1章は序論であり、磁気共鳴法を用いた生体計測の現状と、それを解決するために本研究で注目した高偏極のスピン（プロトンスピン、電子スピン、光偏極電子スピン）およびこれを生体計測に応用するために採用した計測手法について論じている。 第2章は三重共鳴NMRを用いて安定同位体標識グルコースの嫌氣的解糖反応産物を選択的に感度良く検出するための計測方法論およびその有用性について論じている。標識グルコースとしては、全ての炭素原子を^{13}Cで、全ての非交換性の水素原子を重水素原子^2Hで安定同位体標識した$[\text{U-}^{13}\text{C}_6, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6\text{-}^2\text{H}_7]\text{-D-glucose}$（以下、$^{13}\text{C}/^2\text{H}$-標識グルコースと表記）を用いた。$^{13}\text{C}/^2\text{H}$-標識グルコースは生体内で嫌氣的代謝において$^1\text{H-}^{13}\text{C-}^{13}\text{CO}$の構造を持つ乳酸を代謝物として生じる。$^{13}\text{C}$の天然存在比は1.1%程度なので、$^1\text{H-}^{13}\text{C}$の二重共鳴NMRでは$\text{H-C}$の構造を持つ生体内在性分子由来のシグナルは1.1%程度に、$^1\text{H-}^{13}\text{C-}^{13}\text{CO}$の三重共鳴NMRでは$\text{H-C-CO}$の構造を持つ生体内在性分子由来のシグナルは0.0001%程度に抑制される。また、グルコースはH-C-COの構造を持っていないため$^{13}\text{C}/^2\text{H}$-標識グルコースは三重共鳴NMRによって検出されない。これらの条件を利用することで、$^{13}\text{C}/^2\text{H}$-標識グルコース由来の乳酸はグルコースの嫌氣的代謝に特異的なスイッチングプローブとして利用可能となり、HeLa細胞およびマウス結腸腺癌C-26の腫瘍組織における嫌氣的解糖により生じた乳酸およびその副生成物であるアラニンのみを、細胞や組織の抽出物といった複雑な混合物系中で選択的に計測可能であることを示した。また、当該計測手法は磁場勾配で展開することによりイメージングにも適用可能であり、強力な新規分子イメージングツールとして様々な疾病の画像診断への活用が期待できる。 第3章は高感度で細胞内分子の距離情報を取得するための新規生体内計測手法として In-Cell ESR の計測方法論とその有用性について論じている。一般にNMRにおいて距離計測に用いられる核オーバーハウザー効果は0.5 nmという近距離の核間距離情報しか与えないが、タンパク質に対する部位特異的スピン標識法（SDSL法）でアミノ酸残基をスピン標識し、パルスESRにおいて電子スピンの双極子間相互作用を計測する電子-電子二重共鳴法（DEER）を用いることで1.5～8 nmといった広い範囲にわたって0.1 Åの精度で距離情報を取得することが可能となる。本研究ではこの方法論を細胞内での距離計測に応用し、アフリカツメガエル卵母細胞内においてユビキチンの2 nmを超えるアミノ酸残基間距離が評価可能であることを示した。また、1時間経過した後は細胞内の還元作用によりラジカル濃度が半分以下まで低下するが、それでもなおDEER法による距離計測が可能であることを示した。以上の結果から、当該方法論を用いることで細胞内における1時間以内で完了する生命現象であれば、それに伴うたんぱく質構造変化として十分計測可能であることが示唆された。 第4章は、ダイヤモンド窒素-空孔中心（NVC）の光検出磁気共鳴（ODMR）を生体内計測に応用することで、細胞、線虫、マウスといった生体サンプル中における粒子選択イメージング、およ			

京都大学	博士（工 学）	氏名	五十嵐 龍治
び光学分解能を超える回転運動計測の方法論を確立した研究について論じている。可視光は100%近い高い偏極を持つため、蛍光イメージングは極めて高感度な計測手法である。このため、長い間一分子の挙動をリアルタイムで計測できる唯一の手法として、生体内計測、特に細胞内の分子動態を計測する手法として分子生物学の分野で広く用いられてきた。しかし、蛍光イメージングにおいて特定の分子のみを選択的に計測しようとした場合、発光の波長がオーバーラップしない様にして波長で切り分けるか、あるいは極端に蛍光寿命の異なる蛍光色素同士を選びナノ秒オーダーで励起と観察を制御して蛍光寿命で切り分けるなど、多くの制約があるため応用の範囲は非常に限られてくる。本研究では、これを解決する選択的イメージング技術として、波長や蛍光寿命に関係なく、ラジオ波によるサブレベルコントロールを用いることで常にダイヤモンドのNV Cのみを選択的に画像化する計測手法を開発した。ナノダイヤモンドのODMR計測を生体内計測に用いるため、倒立顕微鏡をベースとして、光学遷移をコントロールするための532nmLD励起固体レーザー、磁気共鳴のサブレベルコントロールを行うためのラジオ波発振器、磁気共鳴信号を蛍光イメージとして検出するための電子増倍型CCD（EMCCD）、およびラジオ波発振器とEMCCDを同期的にコントロールするパルス／ディレイジェネレータを組み込むことで、NV Cの三重項電子1対を検出可能な感度を持つODMR顕微鏡を構築した。この顕微鏡にEMCCDで取得した蛍光イメージから磁気共鳴の信号のみを抽出して画像として再構成するためのリアルタイム解析プログラムを作成し組み込むことで、NV Cに由来する蛍光輝点のみを選択的に抽出することが可能な選択的イメージング装置となる。実際にこの装置を使うことで、ナノダイヤモンドと蛍光ビーズを同時に取り込ませたHela細胞の蛍光イメージからナノダイヤモンドのみを選択的に画像化することが可能であった。また、線虫の腸内に取り込ませたナノダイヤモンドのみを自家蛍光と切り分けて選択的に画像化することも可能であった。更に、ヌードマウスの腹部にナノダイヤモンドを皮内注射して計測したところ、マウスの皮内という比較的不透明な場所であってもナノダイヤモンドを自家蛍光から切り分けて画像化することが可能であった。また、論文冊子には未記載であるが公聴会では、NV Cの共鳴周波数は外部磁場との成す角および外部磁場強度のみに依存して変化するため、磁場存在下で周波数スペクトルを取得することにより、ナノダイヤモンド粒子の回転運動を計測可能となることを示した。その方法論の確立および実証を行うと共に、線虫腸管内に取り込ませたナノダイヤモンドに適用した実験を発表した。その結果、200nmのナノ粒子について±1°の精度で回転運動を生体内において計測することに世界で初めて成功した。これは蛍光顕微鏡下において10nm以下の精度の回転運動を計測したという意味でも画期的な成果である。既存の計測技術では観察することの不可能であった微小な変化のみを伴う生命現象を生体内でその場観察することが可能となる新規計測手法であり、分子生物学や細胞生物学など様々な生命科学の研究における応用が期待できる。 第5章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、磁気共鳴法、特にNMRおよびMR Iによる生体内計測は、核スピンの極めて低いボルツマン偏極に制約されるため、感度の低さや計測可能な双極子間距離の短さなどに弱点があるという現状を踏まえ、より高い偏極率を有するスピンを利用することでこれらの弱点を克服し、生体内の対象を選択計測するための磁気共鳴の方法論について論じている。

1. 安定同位体標識と三重共鳴 NMR を用いて細胞や癌組織におけるグルコースの嫌気代謝を選択的にモニタリングする新規計測手法開発について記述している。嫌気代謝により生じる乳酸は潜在的な癌のバイオマーカーあるが、三重共鳴NMRを用いて Carbon-13 標識グルコース由来の乳酸の計測を行うことで生体内在性分子由来の信号が効果的に抑制され、更に非交換性プロトンを重水素に置換することで乳酸とアラニン以外の Carbon-13 標識代謝物由来の NMR 信号が効果的に抑制されることを明らかにした。
2. 電子-電子二重共鳴法 (DEER) を用いた細胞内タンパク質の距離計測について論じている。DEER はパルス ESR により電子間の双極子-双極子相互作用を計測する技術であり、二つのアミノ酸残基をスピン標識したタンパク質に対して適用することで、それらの間の距離を計測できる。この方法をアフリカツメガエル卵母細胞へのタンパク質のマイクロインジェクションと組み合わせることで、細胞内タンパク質のアミノ酸残基間距離が計測可能であることを明らかにした。
3. ダイヤモンド窒素-空孔中心 (NVC) の光偏極スピンを光検出磁気共鳴法 (ODMR) によりリアルタイム計測するための装置開発について論じている。この装置により細胞内や線虫腸管内、マウス皮内に取り込ませたナノダイヤモンドを光学分解能で、選択的に、高い時間分解能で磁気共鳴イメージングすることに成功した。

以上、既存の計測法を生体内計測に適用しただけではなく、ODMR 選択イメージング法などの生体内計測の全く新しい方法論を確立し、その過程で既存のイメージング装置と比較し極めて高い感度と高い時間／空間分解能を備えた磁気共鳴イメージング装置を構築した本論文の内容と成果は、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 24 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た結果、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。