

京都大学	博士 (医学)	氏名	角山貴昭
論文題目	Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function (超長時間1分子追跡法の開発によるインテグリンの動的接着機構の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>1分子蛍光追跡法は、基礎医学・生物学の多くの分野で、重要な手法の一つとして広く用いられるようになってきた。そのもっとも大きな技術的限界の一つは、蛍光分子が光励起されたときの退色/明滅である。特に、生細胞内での分子間相互作用や、分子の特定のドメインへの閉じ込めや結合の観察は1分子蛍光追跡法の最も重要な応用であるにも関わらず、蛍光退色/明滅の影響から、相互作用時間や結合時間など、定量的に正確な観察を実行することは難しかった。</p> <p>これまでの蛍光退色/明滅を抑制するほとんど全ての方法では、試料中の溶存酸素を、ほぼ完全に除去していた。しかし、これは生細胞には適用困難であった。しかも、分子状酸素は、三重項状態の解消や、酸化の効果のために蛍光退色を遅くする効果が見込まれ、さらに細胞内のほぼ全ての部分にアクセスできるという利点がある。そこで、本研究では、酸素分子を賢く活用する可能性を追求した。</p> <p>その結果、試料を酸素分圧2%の気体と平衡に保って動物個体内の溶存酸素濃度と同程度とし、還元剤としてビタミンE誘導体のtroloxを、酸化剤としてその誘導体であるtroloxquinoneを、合計濃度が1mMになるように蛍光色素分子に応じて適度な比で添加することで、実験に用いた13種類の有機蛍光色素のほとんどで改善が見られた。特に、有機蛍光分子のテトラメチルローダミンでは、退色時間(指数減衰時間)を6倍以上延ばせた。蛍光分子SeTau647では、1分子の位置決め精度を23nmとした条件で、退色時間を、100秒程度まで伸ばすことができた(0.1%程度の分子は7分以上追跡できた)。細胞内に位置する蛍光色素についても同様の改善が見られた。培養細胞に対する毒性は限られており、4時間以内では、影響は全く見られなかった。</p> <p>次に本手法を、接着斑において細胞外基質(ECM)と細胞を架橋する膜タンパク質であるインテグリンに応用した。インテグリンは接着斑内外の細胞膜において拡散運動と一時的停留を繰り返し、接着斑内での一時停留には0.1秒レベル(接着斑タンパク質との何らかの相互作用)、数秒レベル(アクチン、または、ECMへの結合)、数十秒レベル(両者への結合で張力依存性)の3種の特徴的な停留時間が認められた。それより長時間の成分は見られなかった。形成頻度は短いものほど多く、これら短い結合のうち平均して5回に1回程度が長く安定な結合となることが推定された。また、数十秒レベルの結合は、接着斑内で一番強い力がかかるとされる接着斑中央から外側へ向かって2/3付近でもっとも頻繁に生じた。これらは、インテグリンが、張力と他タンパク質への結合による調節を受けながら一時停留を起こすことが、インテグリンが細胞の足として機能するための主要な調節機構であることを示唆している。数分から数十分レベルで生起する接着斑の消長は、このようなインテグリンの1分子レベルでの過渡的結合の制御によって可能になっていることが示唆された。</p>			

<p>これらの結果は、多分子レベルでの観察、あるいは限られた時間での1分子追跡では得られないもので、本研究で開発した超長時間1分子追跡法によって初めて可能になったものである。さらに本手法はインテグリン以外の系における生細胞1分子追跡に、さらに、生細胞を用いたあらゆる医学・薬学・農学・生物学分野の蛍光を用いた実験に、重要な改善をもたらす可能性をもっている。</p>
(論文審査の結果の要旨)
<p>一分子蛍光追跡法の大きな限界の1つは、励起光による蛍光プローブ分子の退色・明滅である。生細胞への応用に向けて、より効果的な方法が必要とされてきた。</p> <p>本学位授与申請者は、細胞培養液の酸素分圧を2%とし、さらに細胞毒性の低い酸化剤(トロロックスキノン)と還元剤(トロロックス)を併存させるという方法を考案し、13種類の蛍光プローブ分子を試した。その結果、テトラメチルローダミンとセタウ647で特に顕著な改善が見られた。すなわち、一分子追跡が可能な時間(指数減少時間)が、一分子の位置決め精度を26nm程度に保ったままで、それぞれ31秒と106秒となり、通常の6倍以上の時間の1分子追跡が可能になった。</p> <p>次にこの手法を応用して、細胞外マトリクス(ECM)と細胞内のアクチン線維を架橋する膜タンパク質であるインテグリンの1分子追跡を行った。インテグリンは接着斑内でも拡散運動するが、ECMとアクチン線維の両方に結合して一時停留し、さらに、張力が加わると、停留時間が40秒以上になる事を明らかにした。これはインテグリンの過渡的架橋と細胞接着の関連を明らかにしたものであり、超長時間一分子追跡によって初めて解明が可能となったものである。</p>
<p>以上の研究は、一分子蛍光追跡法の発展と細胞接着の機構解明に貢献し、癌転移や創傷治癒の理解に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成30年10月3日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降