

京都大学	博士 (工学)	氏名	源城 拓哉
論文題目	Fundamental techniques for cell membrane studies at sub-micrometer scale (サブマイクロメートルスケール細胞膜研究の基盤技術)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、細胞膜研究に関する基盤技術として、ポリマーを使用した細胞膜模倣環境ナノディスク、およびダイヤモンド三次元動態計測法を確立した研究結果をまとめたものである。全6章から構成される本論文の各章の内容を以下に示す。</p> <p>第1章は序論である。研究の対象とした細胞膜、その研究手法であるナノディスクおよびダイヤモンドについて解説している。細胞膜は、その組成と動態が生理応答に重要な影響を与える。細胞膜の組成の生理応答や疾患メカニズムに対する影響を調べるための手法として、ポリマーナノディスクを取り上げた。ポリマーナノディスクは、脂質二重膜の疎水性領域をポリマーで囲うことによって成形された、約10メートルの円盤状脂質二重膜である。ナノディスク中で囲われた脂質の組成を変化させることにより、組成の影響を検証できる系として用いられる。一方、細胞膜の動態を三次元的に研究する手法としてダイヤモンドを取り上げた。ダイヤモンド結晶格子内に作られた欠陥中の電子スピンが、磁場などの外部環境に応答することを利用した計測方法を紹介した。加えて、ダイヤモンドの作成方法、および欠陥作成や表面修飾などダイヤモンドの下処理もあわせて概説した。</p> <p>第2章では、脂質の組成が疾患に大きく寄与することを示すため、神経変性疾患であるアルツハイマー病原因ペプチドのアミロイドベータと異なる脂質組成をもつナノディスク間の相互作用による凝集過程の違いに着目している。まず、異なる脂質をもつナノディスクを実際に作成可能であることが示された。次に、ナノディスクの組成によって、アミロイドベータの時系列凝集変化をチオフラビンTアッセイや円偏光二色性スペクトル解析により明らかにしている。続いて、ナノディスクとアミロイドベータの相互作用部位を特定すべく核磁気共鳴法が使用された。最後に、アミロイドベータの細胞毒性を低減できるナノディスクの脂質組成を、神経細胞を用いた細胞毒性アッセイにより示すことによって、新たな創薬の可能性が示されている。</p> <p>第3章では、最適なナノディスクを設計できるように、粗視化分子動力学法を用いた手法を提案している。粗視化分子動力学法では、複数の原子を1つの仮想原子とみなすことで粗視化し、計算負荷を減じることができる点に利点がある。まず、ナノディスクに使用されるポリマーの粗視化方法を紹介する。続いて、脂質組成、脂質分子の数量、脂質に対するポリマーの比率やポリマーの構造が評価項目として検討している。さらに、構成されたナノディスクの温度安定性を評価することによって、原子レベルでのナノディスクの構造安定性を実証している。</p> <p>第4章では、細胞膜の三次元動態を計測するため、ダイヤモンドを使った新たな手法を開発している。ダイヤモンド結晶格子中に存在する窒素不純物と欠陥が隣り合った構造は窒素空孔中心と呼ばれる。窒素空孔中心内の電子スピン状態は蛍光強度変化として読み出せる。外部磁場を印加することにより、その方向に依存する共鳴周波数を蛍光強度変化として読み出すことにより、ダイヤモンドの姿勢を決定できることが実証されている。本手法がタンパク質1分子の動態を追跡できることを、回転運動を示す膜タンパク質を用いて示している。その後、細胞膜の動態計測に応用することによって、細胞膜の動態が細胞骨格密度に依存していることを明らかにしている。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	源城 拓哉
<p data-bbox="172 275 1415 607">第5章では、細胞膜動態の原因のひとつとして考えられる細胞骨格の動態を、ダイヤモンドを用いた手法により計測している。細胞内に存在している細胞骨格をダイヤモンドで標識するため、ダイヤモンド表面を親水性ポリマーや細胞骨格分子で修飾を行なっている。その後、細胞内にてダイヤモンドが細胞骨格を標識していることを、細胞骨格に結合した蛍光タンパク質とダイヤモンドの蛍光が共局在により確認している。細胞骨格の動態は、伸縮、歪み、捻れの3つに分解して評価されている。伸縮や歪みはダイヤモンドの二次元軌跡により、捻れは第4章で開発された計測法により明らかにされている。</p> <p data-bbox="172 618 1415 831">第6章は、本論文で得られた成果について要約した結論である。本論文で開発された2種類の細胞膜に関する計測手法は、細胞膜研究を発展させる基盤的技術になると期待できる。加えて、本手法を用いて得られた細胞膜に関する知見は、脂質組成と動態の新たな洞察を与えるものである。したがって、本論文は細胞膜研究の一助になると期待できる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞膜研究に関する基盤技術として、ポリマーを使用した細胞膜模倣環境ナノディスク、およびダイヤモンド三次元動態計測法を確立した研究結果をまとめたものである。得られた主な成果は次のとおりである。

1. 脂質組成の異なるナノディスクを作成し、組成の違いによるアミロイドベータ凝集過程の評価を行った。ナノディスクの脂質組成を調節することにより、神経細胞に対する凝集由来の毒性を低減させることに成功した。
2. 粗視化分子動力学法による、ポリマーナノディスクの設計方法を確立した。脂質の組成、ポリマーの構造、脂質とポリマーの比率を調節することにより、ナノディスクに必要な条件を示した。高温下において、作成されたナノディスクが構造的に安定していることを実証した。
3. ダイヤモンドを用いた細胞膜動態の三次元計測方法を確立した。ダイヤモンド結晶格子内に窒素空孔中心と呼ばれる格子欠陥を作成することで、格子内の電子スピンを安定的に操作することを可能とした。磁場印加下で生じるゼーマン分裂を、ダイヤモンドの姿勢を決定する手法に応用した。本手法を検証するために、膜タンパク質である F₁-ATPase を用いて、その回転運動を計測した。これによりタンパク質一分子レベルであっても応用可能な手法であることを実証した。複数の分子が混在する細胞膜の動態に対し、本手法を用いた結果、細胞膜の動態が細胞骨格密度に影響を受けることを明らかにした。
4. 細胞膜に影響を与える細胞骨格の動態を、ダイヤモンドを用いた手法により明らかにした。細胞内に存在する標的にダイヤモンドを標識できるよう、ダイヤモンドの表面を修飾する方法、および細胞内への導入方法を確立した。細胞骨格の動態を収縮、歪み、捻れの三方向から解析することにより、細胞骨格の詳細な挙動を明らかにした。

以上、本論文は細胞膜研究における基盤的技術を開発した。本技術は、細胞膜や細胞骨格だけではなく、他の生体分子の動態計測にも応用可能であるため、学術上、実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、令和2年1月27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。