

(続 紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	高 橋 寛 英
論文題目	Force measurement and mapping of biological macromolecules using atomic force microscopy: Development and application of AFM probe modification procedure （原子間力顕微鏡を用いた生体分子の力学測定とマッピング： 原子間力顕微鏡プローブ修飾法の開発と応用）		
（論文内容の要旨） 原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy; AFM）は、先端が数十nmのプローブで試料を走査することにより、試料の表面構造をnmスケールで可視化することができるデバイスである。AFMはまた、プローブの先端にタンパク質を結合させることで、基板上のタンパク質との結合力を1分子レベルで測定することができる。この博士論文では、第1章の導入（Membrane TrafficとExocytosisの概要とAFMの原理）に続き、AFMを用いた生体分子の挙動を1分子レベルで解明することを目的として、第2章、第3章においてAFMプローブへの生体分子の結合方法の開発を行い、第4章ではその結合法を用いてシナプスでの神経伝達物質放出を制御するExocytosisの初期段階の分子機構について解明した。 第2章では、L-グルタチオンプローブの作製を行った。AFMのプローブに、リコンビナントタンパク質精製で汎用されているグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)と特異的に結合するL-グルタチオンを共有結合で結合させる方法を開発した。L-グルタチオンプローブにGST融合の形で精製した核膜孔通過タンパク質、インポーチンβを結合させ、インポーチンα間の結合を測定した。この結果、L-グルタチオンプローブが生体分子間力の測定に用いることができることがわかった。 第3章では、抗体をプローブに結合させる方法の確立を行った。AFMのプローブに少量の消費量で抗体を結合させる方法を開発し、その方法を用いて、細胞骨格の構成タンパク質であるαアクチニン4を認識する抗体をAFMプローブに結合させ、アクチニン4の分子内における抗原部位を同定した。 第4章では、第2章で確立したL-グルタチオンプローブを用いて、神経細胞の開口分泌におけるカルシウムセンサータンパク質、シナプトタグミンと再構成脂質二重膜間の力学測定を行った。L-グルタチオンプローブにGST融合シナプトタグミンを結合させ、再構成膜との結合力を測定した。この結果、シナプトタグミンがカルシウム存在下で再構成膜と強固に結合すること、また、カルシウム非存在下においても、標的膜と結合することが示唆された。 第5章では、本研究で得られた成果と将来の展望を議論した。本研究の成果は、AFMによる機能を保持した生体分子間力測定の方法を確立したことに加え、それを用いて、従来の各種分子間力計測法では発見することができなかった生体分子間相互作用を計測することができたことである。このことはすなわち、新規な生体分子間相互作用の解析法として、AFMの力学測定の有用性を示すものである。			

(論文審査の結果の要旨)

近年、原子間力顕微鏡(AFM)は生命科学の分野で使用されるようになってきている。特に、DNAから細胞までの生体試料のナノメートルスケールでのイメージング法はかなり一般的となった。一方、AFMのもう一つの測定法である「1分子レベルでの分子間力学測定法」の生物学的応用には限界があった。その理由は、AFMプローブの先端に機能を保持したタンパク質分子を取り付ける一般的方法が存在しなかったからである。本学位論文で申請者は、分子細胞生物学に広く応用できるAFMプローブ修飾法の開発を行い、それを用いて、細胞内における膜融合機構の一つである開口分泌の制御機構を解析することに成功した。

従来、タンパク質のAFMプローブへの結合法は、タンパク質表面のアミノ基やチオール基などを介してプローブ表面に結合させるものであり、それらの方法ではタンパク質の構造や分子機能を失活させる可能性があった。そこで、申請者はグルタチオンを結合させたAFMプローブを作成し、AFMプローブの先端にGST融合タンパク質を結合させることができるグルタチオン結合AFMプローブを作成することに成功した。GSTは分子生物学において、タンパク質精製のタグとして汎用されており、GSTと融合させ発現・精製したさまざまなタンパク質をAFMプローブに結合させる画期的な方法を確立した意義は大きい。

さらに申請者は、開発したAFMプローブを用いて神経細胞における開口分泌の分子機構の解明に取り組み、新しい知見を得ることに成功した。神経末端における開口分泌では、シナプス小胞にアンカーされているシナプトタグミンが、細胞内に流入したカルシウムイオン依存的に神経末端内側の細胞膜と結合し、開口分泌を促進することが知られていたが、カルシウム流入前の動態については明らかにされていなかった。そこで、申請者はグルタチオン結合プローブに結合させたGST融合シナプトタグミンと標的膜との1分子レベルでの力学測定を行い、シナプトタグミンがカルシウム存在下においてのみでなく、カルシウム非存在下においても標的膜と結合すること、シナプトタグミンは標的膜上のt-SNAREタンパク質と1分子レベルで直接結合することを示した。これらの知見は、本申請者が確立した新技術によって初めて得られた成果であり、神経細胞における開口分泌機構を理解する上で極めて重要な発見である。

以上から、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成23年2月2日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日