

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	生細胞分子イメージングに基づくタンパク質分子動態と相互作用の定量解析
Title(English)	Quantitative analysis of protein dynamics and interactions by live-cell molecular imaging
著者(和文)	伊藤由馬
Author(English)	Yuma Ito
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9803号, 授与年月日:2015年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:徳永 万喜洋,十川 久美子,山口 雄輝,立花 和則,木村 宏
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9803号, Conferred date:2015/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	伊藤 由馬	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	徳永 万喜洋	教授	木村 宏	教授
	審査員	十川 久美子	准教授		
		山口 雄輝	教授		
		立花 和則	准教授		
			審査員		

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「生細胞分子イメージングに基づくタンパク質分子動態と相互作用の定量解析」と題し、5章から構成されている。

第1章「序論」では、生体分子機能を解明する上で、細胞内における個々の分子の動的特性を明らかにする必要性を述べている。特に、遺伝情報の制御を担うタンパク質因子であるヌクレオソームとそのリモデリング複合体について、現在までの知見を解説し、実際に生きた細胞核内における動態を調べることの重要性を述べている。さらに、蛍光顕微鏡を用いた生細胞の定量観察手法について言及し、多様なタンパク質の動態に対応した解析法が開発されていないために、その活用が不十分である現状の問題点を指摘している。その上で、生細胞分子イメージングを中核に据え、新たな手法開発とともに、遺伝情報と情報伝達に関わる分子の動態解明を、本論文の目的としたことを述べている。

第2章「クロマチンに結合したヒストンタンパク質の核内動態」では、ヌクレオソームの構成因子ヒストンタンパク質の生細胞内動態を解明するため、蛍光標識したヒストン H3.1 および H2A を、生きたヒト由来 HeLa 細胞内で薄層斜光照明法により蛍光 1 分子イメージングし、分子動態を定量的に解析している。平均変位を用いる 1 分子解析手法と、数値シミュレーションを組み合わせる方法を構築した。この手法により、核内ヌクレオソームの動的状態が複数存在し、単一のヌクレオソームが複数の状態間を確率的に遷移するという動的描像を得ている。さらに、ヒストン H3.1 と H2A の動態比較から、状態間の遷移確率の制御がクロマチン機能に重要な機構であるとの新しい知見を得ている。

第3章「クロマチンリモデリング複合体の核内動態」では、INO80 クロマチンリモデリング複合体の主要構成因子 Ino80 に蛍光タンパク質を融合し、低濃度で定常発現させた HeLa 細胞にて生細胞蛍光 1 分子イメージングと定量解析を行っている。その結果、核内 Ino80 の個々の分子は拡散と一時停止を繰り返し、常に動的な状態にあることを見い出している。さらに光褪色後蛍光回復法 (FRAP 法) による定量解析と合わせ、Ino80 は数秒から十数秒の間隔でクロマチンと結合解離を繰り返しながら、常に全体の 3 割の INO80 複合体がクロマチンと相互作用している、という核内クロマチンリモデリング複合体の新たな動態モデルを提案している。

第4章「細胞表面の微小領域内における膜タンパク質の動態」では、生きた細胞表面分子の本来の動態を維持したまま、細胞を基板上に保持する、簡便で汎用的な手法を確立している。ガラス表面上に構築した脂質二重膜は、流動性があり生体分子の結合も可能であり、分子動態保持に適している。しかし従来法では、煩雑なガラス表面洗浄処理や専用装置が必要であるため、生細胞観察への適用に困難が伴い、利用が限られていた。そこで、煩雑な処理や専用装置を必要としない、簡便な脂質二重膜構築法を開拓し確立した。当方法は、均一な膜を再現性高く調製でき、光学顕微鏡に限らず *in vitro* での表面分子の分析など、広汎に脂質二重膜を利用することを可能にしている。

第4章後半では当方法を用いて、免疫細胞表面の活性化微小領域であるマイクロクラスター (約 50 分子以上の集合体) 内における T 細胞受容体 (TCR) とシグナル伝達分子の、生細胞 3 色同時 1 分子イメージングを実現した。定量解析から、マイクロクラスター内の相互作用を反映するものとして、TCR 等のシグナル伝達分子が少なくとも異なる 2 種類の動態をとっていることを見い出している。

第5章「総括」では、以上の結果をまとめ、今後の展望を述べている。

以上を要するに、本論文は、蛍光 1 分子イメージング法と他のイメージング法およびシミュレーションを組み合わせた定量解析法を新たに構築した。また、生細胞表面の分子本来の動態を観察計測できる新しい手法を開発した。これらは、生細胞内の多様な分子動態を明らかにする上で有用性が高く、生理的に重要な機能を果たしている分子について、従来は得ることのできなかった分子動態を解明することを可能にしたものであり、工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。