



Title	Studies of Carbon Nanotubes for Biological Molecular Dynamics Measurement : Fabrication of Sharpened Probes, Trapping of Protein Molecules and Measurement of Protein Interactions
Author(s)	円山, 拓行
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57468
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照ください 。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	まる やま ひろ ゆき 円 山 拓 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学位記番号	第 23806 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科機械工学専攻
学位論文名	Studies of Carbon Nanotubes for Biological Molecular Dynamics Measurement : Fabrication of Sharpened Probes, Trapping of Protein Molecules and Measurement of Protein Interactions (生体分子ダイナミクス計測に向けたカーボンナノチューブの研究：先鋭化プローブの作製、タンパク質分子捕捉、タンパク質相互作用計測)
論文審査委員	(主査) 教 授 中山 喜萬 (副査) 教 授 澁谷 陽二 教 授 高谷 裕浩 准教授 吉村 成弘 (京大大学生命科学研究科)

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体分子反応における分子間相互作用力や質量の時間変化など、一分子レベルでの生体分子ダイナミクスの計測を可能にする手法を、タンパク質サイズより細く機械的強度の優れたカーボンナノチューブ(CNT)を用いて実現するための要素技術研究をまとめたものであり、以下の7章からなる。

第一章では、一分子レベルでの生体分子ダイナミクスの計測についてその意義を述べ、CNTを使った計測法の概要と優位性を示し、本論文の位置づけとその目的について述べた。

第二章では、現状の生体分子計測手法についてまとめた。筋肉の収縮メカニズムの一分子レベルでの解明を目指した生体一分子計測を例にとり、結果の重要性を指摘すると共に、現状の計測法の課題についてまとめた。

第三章では、本研究が目指すCNTを用いた新しい一分子レベルの生体分子ダイナミクスの計測法を詳細に説明しその利点を述べた。計測法の基本は、生体分子の活性を損ねることなくCNTアーム先端で部位特異的に捕捉することである。

第四章では、CNTアームの加工プロセスについて述べた。十分な機械強度をもち、生体一分子を部位特異的に捕捉することを可能にするために、CNTアームを円錐状に通電加工するプロセスを構築した。一定量の電流を瞬時に与えることが重要であることを見だし、その機構について数値シミュレーションにより検討した。

第五章では、CNT先端にタンパク質分子を共有結合させる研究について述べた。ダイナミクスの計測のため、タンパク質分子をCNT先端に強固に結合させなければならない。また、CNT側壁へ非特異的なタンパク質吸着を排除する必要がある。CNT側壁に欠陥がない場合は非特異的なタンパク質吸着の確率が低いこと、また誘電泳動により効率よくタンパク質をCNT先端に結合できることを明らかにした。

第六章では、CNT先端でタンパク質分子の活性を損ねることなく、部位特異的に捕捉する方法について研究した。タンパク質の捕捉部位を遺伝子操作によりラベル化し、化学修飾したCNT先端をそのラベル化部位と反応させる手法を採用した。CNTによる部位特異的捕捉を、タンパク質の活性が損なわれていないことの実証、つまり、

活性部位を利用した他のタンパク質との結合力の計測により検証した。また、分子動力学計算によりタンパク質間の結合エネルギーを見積もり、実験結果を定量的に議論した。

第七章では、本研究で得られた結果を総括した。

論文審査の結果の要旨

生体分子反応における分子間相互作用力や質量の時間変化などのダイナミクスを、一分子レベルで計測することは、生命現象の解明にとって極めて重要であるが、現在はその手法がない。本研究は、タンパク質のサイズより細く機械強度に優れたカーボンナノチューブ(CNT)を用いて、これを可能するための要素技術として、CNTの加工法、CNT先端へのタンパク質捕捉と捕捉位置の制御性について明らかにし、一分子レベルのタンパク質間相互作用力の計測を実現したものである。主な成果を要約すると以下のとおりである。

- (1) 先端にタンパク質一分子のみを捕捉できる細い先端径と、水溶液中で撓みや共振周波数の計測が行える剛直性を併せもつ CNT アームとして、円錐形状を提案しその加工法を確立した。通電加熱による高温・短時間処理により先端径 1 nm 程度に先鋭化した円錐形状を作り出した。また、その機構を低温・長時間処理による注射器形状作製と対比しながら計算機シミュレーションにより明らかにした。
- (2) タンパク質として Qdot-ストレプトアビジンを選び、側壁にタンパク質を付着させることなく、CNT 先端にタンパク質を共有結合させる手法を確立した。酸化により CNT 先端を開端し、カルボキシル基を導入、そこにカルボジイミドを介して、タンパク質表面のアミノ基と共有結合させることができることを示した。CNT 側壁に非特異的に結合したタンパク質は水流で容易に取り除けることも示した。
- (3) 誘電泳動によりタンパク質を CNT 先端に効率よく捕捉できることを示した。電極から突出した CNT に交流電界を印加し、そこへタンパク質のストレプトアビジンを分散した水溶液を滴下すると、電界の最も集中する CNT 先端のみにタンパク質が捕捉される。タンパク質の比誘電率(約 100)が水溶液の比誘電率(約 80)より大きいことを有効に利用したものである。
- (4) CNT 先端にタンパク質の特定部位を捕捉する手法を確立した。タンパク質として遺伝子操作により特定部位のアミノ酸をアジドチロシンで置き換えた importin α を用いた。このアジドチロシンのアジド基と予め CNT 先端に結合させたトリアルルフオスフィン誘導體との Staudinger 反応により、CNT 先端に importin α の活性部位を損なうことなく捕捉できることを示した。その実証を兼ねて、importin α と特異的に結合する importin β との二分子間の相互作用力の計測を行い、特有の結合エネルギーの実測に成功した。

以上のように、本論文では、新しい素材の CNT を用いることによって生体分子を個別に操作できることを明らかにし、一分子レベルでの生体分子ダイナミクスの計測への道を拓いた。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。