The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Study of measurement of molecular turnover and mechanics in living cells
Author(s)	齋藤, 匠
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/88093
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　齋藤　匠　）	
論文題名	Study of measurement of molecular turnover and mechanics in living cells （生細胞における分子交換と力学の測定に関する研究）

論文内容の要旨

細胞内のタンパク質は、ターンオーバーと呼ばれる化学反応によって絶えず分子交換を行う。光褪色後蛍光回復法（FRAP：Fluorescence Recovery After Photobleaching）は、生細胞内分子の動態を評価する手法の一つである。短時間のFRAP計測では、ターンオーバーに関係する個々のタンパク質はブラウン運動に基づく拡散によって輸送される。これまで、この拡散と化学結合の複合作用を解析的に分離するための数理モデルが開発されてきたが、タンパク質が複数の機能的ドメインを持ち、それらドメインが独立して他分子と相互作用する場合は、測定値を個々のドメインの性質に帰着させることは困難である。また、長時間の測定では、特定の方向にタンパク質が輸送される細胞内の移流が無視できなくなり、それに応じて局所的な化学平衡の空間分布さえも移動する。さらに、FRAPで光褪色により標識された領域は、移流だけでなく、タンパク質の活発な運動により生じる収縮力に起因して構造変形を受けることがある。このような、力学・化学的要素からなる複雑なターンオーバーのメカニズムを解明することが課題である。そこで、我々は、化学反応によるターンオーバーを時間スケールで分類し、力学・化学的な現象を明らかにするために、FRAPに基づく新たな分子交換計測手法を開発した。測定対象として、(i)分子拡散からなる短時間のターンオーバー（～sec）、および(ii)流動と(iii)構造変形を含む長期ターンオーバー（～sec-min）が挙げられる。(i)では、FRAPと反応拡散モデル、および化学的相互作用を調整する遺伝子工学を組み合せ、純拡散とドメインレベルの解離平衡定数を区別した。(ii)と(iii)では、連続体力学に基づくFRAP解析モデルを構築し、標本タンパク質とその反応物との解離速度、空間移動（移流）、構造変形（ひずみ）を計測した。以上から、本研究では生細胞の複雑なターンオーバーを理解するための数理・実験的な枠組みを開発した。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　齋　藤　匠　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	出 口 真 次
	副 査　教 授	和 田 成 生
	副 査　教 授	杉 山 和 靖

論文審査の結果の要旨

本論文では、細胞内の力学的、化学的状態を計測することができる方法論を提案し、その有効性を実証する研究を行った。具体的には、FRAPと呼ばれるレーザー計測手法を基盤技術として、力学モデルによる解析、および遺伝子変異体を用いた解析を組み合わせ、それによりタンパク質の各機能ドメインの化学平衡定数、および細胞内の局所移流速度と力学的ひずみ量を計測することに成功した。まず、対象となるタンパク質のドメイン欠損変異体を網羅的に作製し、そのFRAP応答（ターンオーバーと呼ばれるタンパク質の分子交換速度）におけるわずかな差異を力学的に解釈し、各ドメインと結合タンパク質との化学平衡定数を決定するとともに、それらの化学結合の影響を排除した純拡散係数を測定した。得られた数値について多角的に検証し、その有効性を確認した。細胞内タンパク質に関するドメインレベルでの化学平衡定数の決定は初めてのことであり、とりわけ新規性が高い成果と言える。細胞内タンパク質間の複雑なシグナル伝達機構の解明に向けて細胞生物学分野において研究が進む中、本手法が今後有効活用されることが期待できる。さらに、移流速度・ひずみの計測においては、連続体力学の理論と分子交換に関するタンパク質反応科学の理論を組み合わせた解析を行った。本手法の有効性を示すために間葉系細胞を対象として、移流、ひずみ、分子交換の細胞内空間分布を明らかにするとともに、細胞骨格調節薬剤導入実験の解析と併せてどのように個々のタンパク質の化学反応とその複合体が作る細胞内構造物の力学的挙動が関連しているかを明らかにした。これらは上述の細胞内シグナル伝達のメカニズムに一層の理解をもたらすことに加え、個々のタンパク質に対する特異的阻害薬の効果を計測できる手法として活用されうること、さらには機械科学・応用力学分野が扱う対象を化学的解析と組み合わせることにより生きた細胞へと展開して学問の拡大と深化に貢献したという点から、科学的、工学的、学問的な意義は大きい。とりわけ学際性の極めて強い細胞科学分野において実用性の高い新規計測手法を開発し、多くの基礎的知見を得たことは評価できる。本成果の一部は細胞実験分野の代表的な国際誌に掲載され、また本研究の基礎となる研究成果も細胞バイオメカニクス・メカノバイオロジー分野の代表的な国際誌に掲載されている。以上より、博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。