

Development of linear and nonlinear microspectroscopy for nondestructive redox state analysis of hemoproteins in biological samples

その他のタイトル	非破壊に生体内ヘムタンパク質の酸化還元状態を分析する線形・非線形顕微分光法の開発
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073348

論文審査の結果の要旨

氏名 瀬川 尋貴

本論文は、顕微分光法を利用した、生体試料中ヘムタンパク質の酸化還元状態を、非破壊的に分析する手法の開発に関する研究結果をまとめたものである。

本論文は全5章からなる。第1章では、ヘムタンパク質の構造や生体中における機能とその作用機序を概説した後、異なるヘムタンパク質の具体例の説明、および既存の酸化還元状態の分析法の問題点について述べている。ヘムタンパク質は、ヘムと呼ばれる補因子を有する一群のタンパク質であり、ヘムタンパク質の機能はヘムの酸化還元活性によって担われている。これまで、その機能発現機構の解明のために、生化学的な手法を用いた酸化還元状態の分析が行われてきた。しかし、その破壊的な実験過程のために、空気酸化等による誤差や、生体試料内で機能する真の状態を分析できないという問題点を抱えていた。以上の背景を説明した上で、本研究の目的が非破壊的に生体内ヘムタンパク質の酸化還元状態を分析する手法の開発であることを述べ、開発した手法の特徴と意義を説明し、論文全体の導入としている。

第2章では、405 nm 励起共鳴ラマン顕微分光法を利用した、ヘムタンパク質の一つであるシトクロムの分析法について記述している。はじめに、ラマン散乱及び共鳴ラマン散乱の原理と、405 nm 励起を行う利点を述べている。実際に、既報の 532 nm 励起法と実験精度に関する定量的な比較を行い、生細胞を対象とする測定における 405 nm 励起の優位性を示した。更に、実験誤差の定量的な見積もりと、酸化還元動態追跡の可否を評価した。最後に、紫外線照射により誘起したアポトーシスにおける、細胞内シトクロムの酸化還元状態の経時変化を評価した。その結果、シトクロム b とシトクロム c のうち、後者のみが選択的に酸化されるという現象を観察することに成功した。先行研究との比較から、シトクロム c の酸化は、アポトーシスのシグナル伝達過程において生じる、選択的な反応であることを考察している。この結果は、生細胞内のシトクロム類の酸化還元状態を、単一生細胞レベルの分解能と非破壊性を有する本法で分析したからこそ初めて得られた結果であり、シトクロムの関わる生命現象の研究に大きく資する成果である。

第3章では、電子共鳴三次和周波発生顕微分光法の開発と、ヘムタンパク質の一種であるヘモグロビンへの応用について記述している。はじめに、三次和周波発生の原理と、発生機構に3つの中間状態が寄与するという特徴を元に、共鳴効果が生じること及びスペクトル解析から分子の酸化還元状態に関する情

報を引き出せる可能性があることを説明している。次に、シトクロムの測定によって、三次和周波発生が電子共鳴効果によりその強度を増大させることを示した。さらに、酸化型及び還元型ヘモグロビンの測定でも共鳴増強が観察されたこと、ならびに両者のスペクトルが異なることを示した。一方で、得られたスペクトルは大きな歪みを有しており、そのままでは定性的な議論に留まってしまう結果であった。そのため、観察されたスペクトルの歪みの理由を、三次和周波の発生機構の理論的に解析し、その解析結果を利用することで、共鳴三次和周波スペクトルから、ヘモグロビンの電子状態を直接分析できることを明らかにした。開発した三次和周波発生顕微分光法は、非破壊的なヘムタンパク質の酸化還元状態を分析可能にする点において、極めて高い学術的価値を有する成果である。

第4章では、三次和周波発生顕微分光法の生体試料への応用可能性を記述している。非線形光学現象の生物応用について概説し、その特長のひとつであるマルチモード性を活用するために、顕微鏡を拡張し、三次和周波発生に加え、第二高調波発生及びコヒーレント・反ストークス・ラマン散乱の同時検出を可能にした。具体的な試料としてラット角膜を測定し、角膜の内部構造が、前処理を一切必要とせず可視化できることを示した。この結果、上皮細胞の細胞膜や細胞核、基底膜、実質細胞、コラーゲン繊維など、多様な内部構造が可視化された。得られた画像は、角膜の構成分子種の情報を反映しているという特徴を有しており、これは他の可視化技術では実現しえない本法の優位性を実証している。

最終章である第5章では、本研究において開発した分析手法を要約するとともに、各手法が与える情報の種類とその学術的意義、今後応用可能な研究対象及び将来的な研究展望について述べ、論文全体を総括している。

なお本論文は、島田林太郎氏、河村玄気氏、加納英明氏、加治優一氏、大鹿哲郎氏、福武直樹氏、Philippe Leproux 氏、Vincent Couderc 氏との共同研究の成果をまとめたものであるが、論文提出者が主体となって実験およびデータ解析を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。