

## 論文内容の要旨

博士論文題目 Bond strength measurement between the single cell adhesion molecules, nectin and cadherin, using high sensitive Intermolecular Force Microscopy (高感度分子間力顕微鏡による細胞間接着分子ネクチン・カドヘリンの1分子間結合力計測)

氏名 塚崎 克和

細胞接着は、形態形成や細胞の分化・増殖・移動といった多岐にわたる細胞過程に重要な役割を担っている。この重要な細胞接着について、その詳細な機構を理解するため、分子レベルでの接着機構解明が望まれていた。本研究では、上皮細胞間の接着に重要なネクチン、カドヘリン接着タンパク分子を取り上げ、これらの相互作用特性を、サブピコニュートン(pN)の力感度を有する高感度計測系を自作して明らかにした。上皮細胞間の接着にはアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションそしてデスモソームなどの細胞間接合体が関与するが、アドヘレンスジャンクションは他の接合体の形成、維持や崩壊を動的に調節するなど最も注目される。ネクチンとカドヘリンはそこで働く細胞間の認識・接着形成の初期過程を仲介する細胞間接着分子で、接着に寄与する細胞外ドメインをネクチンは3つ、カドヘリンは5つ持つ。本研究ではこれら接着ドメイン群とIgG抗体のFc断片部とのキメラタンパク質を作製した。それらを、ピエゾで位置制御されるガラスビーズ表面と、極細ガラス針先端の極微小ガラスビーズ表面に固定し、両者を接近させてその相互作用の状況をガラス針の変位としてサブnm分解能で観察した。この従来と比較して数十倍高感度でサブpN測定が可能な分子間力顕微鏡による観察により、1分子レベルでネクチン・カドヘリンの細胞外相互作用の多状態性を直接的に観察することに世界で初めて成功した。結合力の測定結果の解析ではKramersらの理論を拡張発展して応用し、ネクチンにおいて3つの結合状態、カドヘリンにおいては4つの結合状態があることを同定した。さらに、それぞれの結合力分布に基づき、結合状態パラメータであるライフタイム・結合長を定量した。これらの結合状態パラメータを比較・解析することにより、ネクチンの複数のドメインは、非協調的なジッパー状システムとして振舞い、カドヘリンの複数のドメインは、協調的なパラレルシステムとして振舞うことが示唆されるとした。観察されたこれらの動的な特性は、ネクチンが細胞間の認識過程において調査的に相互作用するために、一方で、カドヘリンが細胞間の接着形成過程において安定な相互作用を形成するために、有用な分子メカニズムであると考えられる。

氏名	塚崎克和
----	------

(論文審査結果の要旨)

多細胞生物においては、個体全体が1つのシステムとして正常に機能するために、個々の細胞は周囲の細胞を互いに正しく認識して、細胞接着を行う必要がある。この細胞接着研究は、これまで細胞レベルでの研究、電子顕微鏡観察などによる構造研究、遺伝子的アプローチなどが行われてきたが、細胞接着を担っている接着分子そのものの相互作用を直接的に測定するところみはなかった。これは、接着分子間の相互作用がサブピコニュートンの力であり、従来の測定装置では測定不可能であったためである。このような状況で、申請者は超高感度な分子間力測定装置を独自で作り上げ、上皮細胞接着の重要な接着タンパク質であるネクチンとカドヘリンの相互作用を直接観察することに挑戦し、その計測に成功すると同時に、これらの接着分子の結合状態の違いを明らかにした。得られた成果は以下のとおりである。

1. 接着分子として、上皮細胞接着に重要なネクチンとカドヘリンを選択し、その接着ドメインと IgG 抗体 Fc 断片とのキメラタンパク質を作製することで、接着ドメインを提示するガラスビーズを作製した。その後、サブピコニュートンでサブ nm 変位する極細ガラス針を作製し、その先端に ZnO ウィスカーを介して接着ドメイン提示ガラスビーズを固定し、大型の接着ドメイン提示ガラスビーズとの相互作用により、接着ドメイン間の相互作用の直接観察に成功した。この自作した分子間力顕微鏡の測定データは、熱擾乱によるノイズに対して優位性のあるデータであることを確認している。
2. 結合力の測定結果から、ネクチンにおいて3つの結合状態、カドヘリンにおいて4つの結合状態を結合力分布として直接的に観察することに成功した。さらに、それぞれの結合力分布に基づき従来の理論を拡張応用して、結合状態パラメータであるライフタイム・結合長を定量的に導出した。この結果を比較・解析することにより、ネクチンの複数のドメインは、非協調的なジッパー状システムとして振舞い、カドヘリンの複数のドメインは、協調的な平行システムとして振舞うことを明らかにした。

以上のように、本論文では、細胞接着タンパク質の、一分子間の相互作用の計測に初めて成功し、考察の結果、接着分子内の複数の接着ドメイン間の相互作用に分解した結合力発生機構を明らかにした。本研究は、以上のように分子レベルで細胞間接着を初めて計測し、その機構を明らかにしたという意味で学術的価値が高い。よって審査委員一同は本論文が博士(工学)の学位論文として価値あるものと認めた。