

氏名	中村 浩二
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位記授与番号	甲第 4332 号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	細菌細胞膜に対する whole-cell mode パッチクランプ法によるイオン輸送系の解析法の開発
論文審査委員	准教授 黒田 照夫 教授 岡本 敬の介 教授 三好 伸一

学位論文内容の要旨

パッチクランプ法はイオン輸送タンパク質を測定する上で、非常に有用な方法であり、細菌細胞においては専ら単位タンパク質あたりの活性が大きなイオンチャネルの解析に応用されてきた。本論文の最終的な目標は、同法を用いて様々な細菌のイオン輸送タンパク質を広く測定できる系の構築を進めることである。

私たちの研究室では大腸菌から巨大な protoplast (giant protoplast, GP) を調製する方法を開発した。大腸菌の GP に対する whole-cell recording mode パッチクランプ法により、解析対象となる膜面積が広がり、これまでに捉えられなかった呼吸鎖や F_0F_1 -ATPase によるイオン輸送が電流値として捉えられるようになった。

これまでの生化学的な解析において、ある種のグラム陽性菌由来イオン輸送タンパク質を発現させた場合、その宿主が大腸菌である場合と枯草菌である場合では異なる基質特異性を示したことが知られている。よって、グラム陽性菌の解析宿主として、枯草菌細胞膜への whole-cell recording mode パッチクランプ法を確立する必要があると考えた。

まず、枯草菌の GP を調製する方法を確立した。枯草菌 GP の内部には植物細胞の液胞のような構造体 (giant provacuole, GV) が観察され、GV を単離精製してのキナクリン蛍光クエンチング法によって GV が反転構造を持つことが明らかとなった。そして、適切な浸透圧ショックにより GV を露出させ、GV に対してパッチクランプ法を適用し、呼吸鎖や F_0F_1 -ATPase の活性を捉えることに成功した。さらに、呼吸鎖の活性に呼吸鎖阻害剤 KCN や 2-heptyl-4-hydroxy quinoline-N-oxide (HQNO) が与える影響を調べた。これらの解析により枯草菌の GP や GV に対して whole-cell recording mode (GV の場合は whole-vacuole recording mode) パッチクランプ法を適用できる系を開発した。

大腸菌では既に GP や GV に対する whole-cell recording mode (GV の場合は whole-vacuole recording mode) パッチクランプ法の適用が確立されていた。しかし、これを利用した呼吸鎖、 F_0F_1 -ATPase 以外のイオン輸送タンパク質の解析はあまり行われていない。大腸菌 GP や GV へのパッチクランプ法により様々なイオン輸送タンパク質が解析されるためには GP に特化したタンパク質大量発現系が必要であると考えた。

大腸菌の GP に特化した発現系に、GP において発現が亢進している遺伝子の promoter を利用することを考えた。DNA マイクロアレイを用いた予備的 transcriptome 解析によって該当する遺伝子のスクリーニングを行い、GP において特に発現が上昇している 11 個の遺伝子を同定した。そして、そのうち 10 個の遺伝子の転写レベルを RT-PCR 法で、翻訳レベルを GFP レポーターアッセイで詳細に調べ、それら遺伝子のうち、4 つの promoter に関して発現系への応用の可能性を見出した。

論文審査結果の要旨

本論文では、細菌細胞膜に対するパッチクランプ法の適用範囲を、さらに広範囲な細菌においてかつより多くのイオン輸送タンパク質にまで広げることを目的とした研究について述べられている。グラム陽性菌の一つである枯草菌をパッチクランプ法に適用可能な大きさまで巨大化し、内部に出現するProvacuoleについて解析を行った。生化学的解析からProvacuoleにおいて膜の配向性が反転していることを明らかにし、パッチクランプ法を適用するために種々の問題を克服し、実際に呼吸鎖を介したH⁺輸送活性を電流値として捉えた。グラム陰性菌である大腸菌での同法の適用は既に報告されているが、グラム陽性菌では初めての例となる。一方で、巨大化した細胞に特化した大量発現系を構築するために、巨大化の過程における種々の遺伝子発現を調べ、巨大化した大腸菌内で発現量が上昇している遺伝子を同定した。既存の大量発現系では巨大化した大腸菌ではうまく発現できないという問題点を克服する第一歩となる結果であり、パッチクランプ法の適用範囲を拡大する重要な研究であるとみなすことができる。

論文中、やや難解な部分がありそれらについては訂正を求めた。また本学位論文のアピールポイントが分かりづらいという指摘を行い、最終試験の際にはこの点をわかりやすく説明してほしいということを伝えた。そのほかの点については論理的に記述されており、文献引用も的確である。

以上のことから、本研究論文は博士の学位に値するものであると判断する。