

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 杉山 博紀

序

リン脂質が水に分散して形成する袋状の細胞膜モデル（リポソームと呼ぶ）は、その発見以降 50 年間も理論・実験の両面で研究がすすめられている。特に、イオンや小分子のリポソーム膜の透過は、細胞膜機能である受動輸送のモデルとして注目され、濃度勾配にしたがった拡散過程が支配的であると考えられてきた。しかし、杉山氏は、細胞サイズのリポソームについて、双方向制御可能な同時並列観測プラットフォームを構築し、再現性高く統計的にリポソーム動態を計測することで、定常流れ場下のリポソームでは濃度勾配にさからって特定の小分子やイオンが濃縮されるという新規の非平衡現象を見出した。杉山氏の博士論文は、その新規装置開発と見出した新現象の機構について論じたものである。

論文の概要

第 1 章では、本研究の背景、目的とその意義が述べられている。特に、細胞膜モデルとしてのリポソームの動態を統計的に追跡するにあたり、従来の計測法の問題点を挙げ、その解決策として、リポソーム動態を定量性高く同時並列観測できるマイクロ流体デバイスが重要であると、先行研究とその議論の経緯に沿って、論じられている。

第 2 章と第 3 章では、リポソーム動態を同時並列観測できるマイクロ流体デバイスの特性を活用した、双方向制御型の実験プラットフォーム（杉山氏はこのプラットフォームを MANSIONs と名称した）の設計指針と、その性能評価のための実験結果がまとめられている。制御系が異なる電動顕微鏡ステージ、電動ポンプ、電動バルブおよび顕微鏡画像解析ソフトウェアを統合できる制御プログラムの開発、物理的摂動に対して安定に観測を継続できるマイクロ流体デバイスの新たな設計と作製について述べられている。MANSIONs によって杉山氏は、単分散性のリポソーム（平均粒径：11.7 μm 、変動係数：8%）の浸透圧応答について、25 個以上同時並列観測することにより、流れの有無に依存せずに、水の透過速度が従来法の計測値と同等であることを示すことに成功した。浸透圧応答を調べる実験条件の最適化を双方向制御で自動化できた原因を、マイクロ流体デバイス内で捕捉され続けるリポソームの大きさの閾値と関連させることで考察した。また、リポソーム型人工細胞の構築で有用とされる、油中水滴エマルションの界面通過を利用した作製法で調製されたりポソーム分散液を用いて同様にリポソームの浸透圧応答を調べ、本作製法でつくられたリポソームにおける水の透過速度は低くなることを見出した。その理由について、先行研究を引用しながら、作製行程中で油分子がリポソーム膜に混入し、その結果、膜の疎水性が高まるためだと議論した。

第 4 章と第 5 章では、特定のイオン性の蛍光分子や水素イオンについて、マイクロ流体デバイスで捕捉されたりポソームの膜透過速度を調べた結果を論じた。水溶性蛍光色素で

あるウラニンの水溶液を一定の流れ場で捕捉されたリポソームに添加すると、ウラニン由来の蛍光が、リポソーム周囲よりも内部の方が強まることが統計的に示された。ウラニンの蛍光強度の pH 依存性を利用した実験の結果から、リポソーム内部へ確かにウラニンが透過して、内包され、その結果、リポソーム内濃度が周囲のそれより数倍～数十倍高くなることが明らかになった。また、同様の実験結果は、蛍光団を担持したアデノシン三リン酸 (ATP) 誘導体の水溶液をリポソームに添加した実験でも観測された。この現象が起こる要因について、リポソーム構成分子の組成を変えたり、特定の構成分子の蛍光プローブを用いたりして実験を積み重ね、リポソーム膜の表側（外葉）と裏側（内葉）で流れ場から受ける外乱が異なることで、内外葉の組成や粗密が変化し、その結果、これら分子やイオンが内部へ速く透過するが、外部へは遅く透過するため、と考察した。

第 6 章は、以上の研究成果が、基本的な膜透過の知見に新たな理解を加える必要性を指摘するものであること、原始地球環境で原始細胞が高度な細胞機能獲得に必要な分子 (ATP など) を内部に濃縮できた謎に光をあてること、リポソーム型人工細胞の創成や新たな細胞機能の描写に大きく貢献することとして意義づけられ、展望がまとめられている。

審査結果

この論文を受けて審査会では、以下のような質疑討論を行った。

第 2 章と第 3 章において、MANSIONS の設計と実装プロセスの独自性が高く評価された。一方で、従来のマイクロ流体デバイスを用いたリポソーム測定実験装置との差別化を明確に示すべきとのコメントがあり、その改訂が行われた。

第 4 章と第 5 章において、定常流れ場下で捕捉されたリポソームにおける分子濃縮現象の要因について高い関心が寄せられた。この現象の要因の考察に足りうる実験結果を、理解しやすくなるように整理して提示するよう要望があり、新たな実験データが追加され、論文の改訂がなされた。

杉山氏の博士論文は、新たに構築した実験プラットフォームにより、これまで議論されてこなかったリポソームの動態を浮き彫りにした先駆的研究を論じたものである。以上より、本論文は、関連分野の発展に大きく貢献するものである。

結び

論文の公表状況をここに述べる。第 2 章、第 3 章、第 4 章の内容について、筆頭著者となった原著論文が国際専門誌 *Communications Chemistry* 誌、*ACS Omega* 誌でそれぞれ公開中である。第 5 章の内容についても、杉山氏は筆頭著者として原著論文を執筆している。それぞれ共著者との共同研究であるが、杉山氏が主体的に実験・解析・論考を行ったもので、寄与は十分であると判断される。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。