

# 論文の内容の要旨

論文題目 粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスを用いた  
ジャイアントベシクル動態の同時並列計測

氏 名 風山 祐輝

本論文は、生体膜モデルとして注目されているジャイアントベシクル (GV) 研究の現状を受け、デバイス上流で GV を望みの粒径に絞り込み、下流で均一粒径の GV を複数空間配置できる粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの開発を研究目的とし、さらにそれを用いて同時並列計測して明らかになった GV 動態を論じるものである。

第 1 章では本論文の背景や目的と共に、研究の意義やそれによってもたらされる波及効果について述べた。生体膜モデルとしてのみならず、人工細胞や原始細胞モデル創成の観点からも興味深い GV に対し、マイクロ流体デバイスを導入した研究の意義について述べた。GV を用いた生体分子動態のスクリーニング基盤技術や、近年注目が集まっている人工細胞の動態解析、分子の化学反応に基づく情報通信技術への応用可能性を説明した。

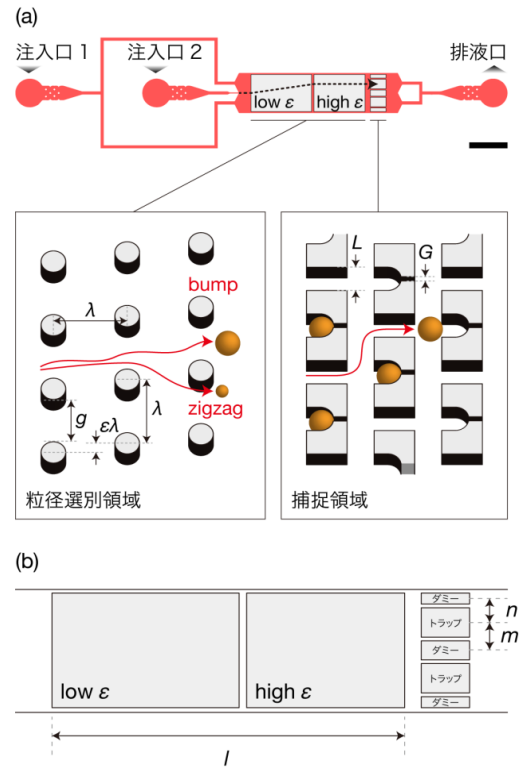


図 1：粒径選別・空間配置複合型流路の模式図。スケールバー = 2 mm。

第2章では、GVのための粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの設計指針と、その性能評価のための実験について述べた。流路の模式図を図1に示す。本研究で粒径選別の手法として採用した決定論的横置換法(DLD)について、その基本原理を示し、GV研究への有用性を述べた。作製したデバイスを用いて、12, 16, 20  $\mu\text{m}$ の3種類の標的粒径に対し、総じて変動係数12%未満で均一粒径GVを67個以上空間配置することに成功した(図2)。曲げ弾性係数に関する実験結果と考察から、実際に捕捉されたGVの粒径が設計よりも約10%大きくなったことは、GVに含まれる酸性リン脂質の静電相互作用に基づく反発力が見かけの曲げ弾性係数を上げていることが原因と考察した。次に、捕捉効率の観点から本デバイスを評価した。トラップと1対1対応したGVを高効率で得るためには、トラップの配置条件に加え、観察時刻やトラップの幾何学的構造そのものにも配慮が必要であることを示した。

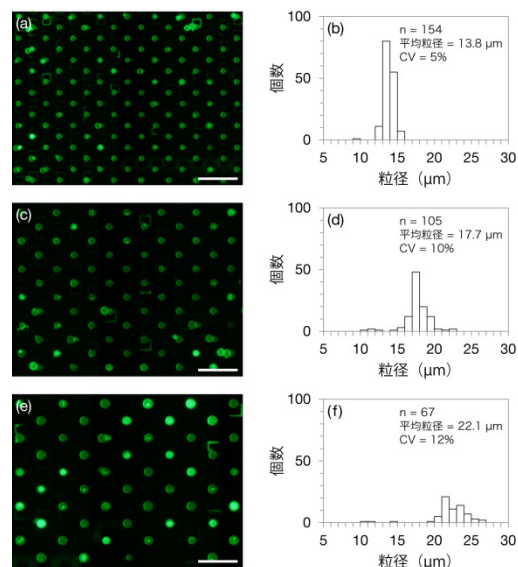


図2：捕捉されたGVの蛍光顕微鏡像と粒径分布。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。

第3章では、連続的な浸透圧刺激に対するGVの形態変化を同時並列観察する実験について論じた。はじめに、従来の顕微鏡観察に基礎を置きつつ、解析のスループットを統計解析の域にまで高め得る手法として、マイクロ流体デバイスを用いた同時並列計測の重要性を述べた。標的粒径12  $\mu\text{m}$ のデバイスと標的粒径20  $\mu\text{m}$ のデバイスを用いた実験から、連続的な浸透圧刺激に対するGVの応答は初期粒径に依存して異なることが分かり、浸透圧変化に対する粒径変化と膜余剰面積の増大速度に差異があることが示唆された(図3)。また、収縮時の水の膜透過率を算出したところ、文献での報告値と整合する結果を得た。従って、本デバイスのGVは流れ場やマイクロポストから力学的ストレスを受けるが、これらは流速を遅くするなどすれば、GVの変形モードや脂質膜の物理化学的特性を大きく変化させるものではないことがわかった。

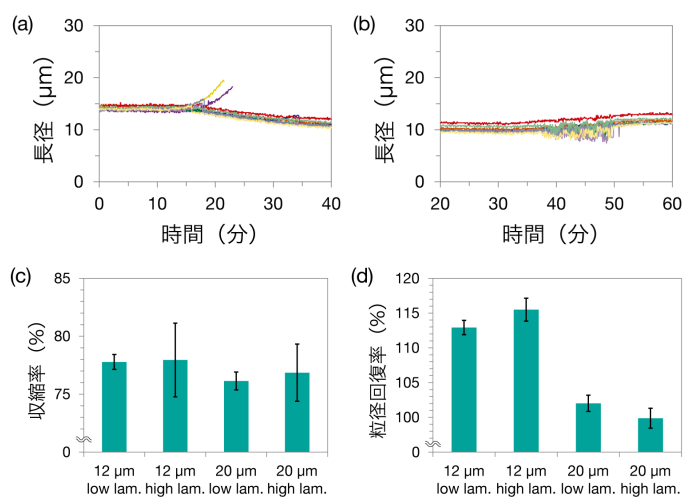


図3：低張液導入時のGVの収縮(a)と高張液導入時のGVの再膨張(粒径回復)。収縮率と粒径回復率の粒径及び膜多重度への依存性(c, d)。

第4章では、脂質ドメインを形成するGVの流れ場中における挙動と、ホスファチジルセリン含有GV及びホスファチジルセリンを含有しないGVそれぞれに対して、捕捉後にアネキシンVにより摂動を加えた場合の応答特性の評価実験について述べた。ホスファチジルセリンとスフィンゴミエリン・コレステロールを含む混合リン脂質のドメイン形成GVを作製し、デバイスに導入することでその挙動を観察した。その結果、高流量時には、流れ場から受ける力学的

的ストレスの影響だと思われる、縞状の脂質ドメインを持つGVが多く観察されたのに対し、低流量時には単純分散液の観察結果と同様の半球状の脂質ドメインを持つGVがチップ内部で回転する挙動が観察された。次に、アネキシンVを用いて捕捉後のGVに対して外部から摂動を加える実験を行ったところ、市販のアポトーシス検出キットの600分の1未満という極めて低濃度にも関わらず、ホスファチジルセリン含有GVの場合は膜の破裂に至るほどの鋭敏な応答を示すことが明らかになった。

第5章では、DNA-コレステロール複合分子を用いた、GV膜上での連続的なDNAの二重鎖形成反応の同時並列計測の実験について述べた。反応の模式図を図4a-cに示した。配列に依存した分子認識能を有し、かつ配列設計により容易に多様性を生み出すことのできるDNAは、GVの多機能化やGVどうしの相互作用の研究の中で重要な位置にあることを述べた。デバイスに蛍光型DNA-コレステロール分子を含むGVを導入し、このDNAと相補的な配列をもつクエンチャー型DNA-コレステロール分子、続けてクエンチャー型DNA-コレステロール分子と強く二重鎖形成反応するDNAを外部溶液より順に導入したところ、GV膜の蛍光強度の減少と回復がみられた(図4d)。30個のGVに対する膜上蛍光強度の時間変化の解析から、2回目の二重鎖形成反応の後、いずれのGVも膜上蛍光強度は初期強度の $78 \pm 5\%$ まで回復することが分かった(図4e)。これらの蛍光強度の時系列変化の違いも明らかになり、この実験結果はGV膜上での化学反応が個々のGV膜の状態からの影響を受けてばらつくことを示しているものとして大きな意味を持つ。

以上、粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの開発を通じて、GVに対しても粒径選別と並列配置が可能であることを示せたとともに、GVの柔らかさや膜組成がデバイスの性能に与える影響について明らかにできた。デバイスを用いたGVの同時並列計測

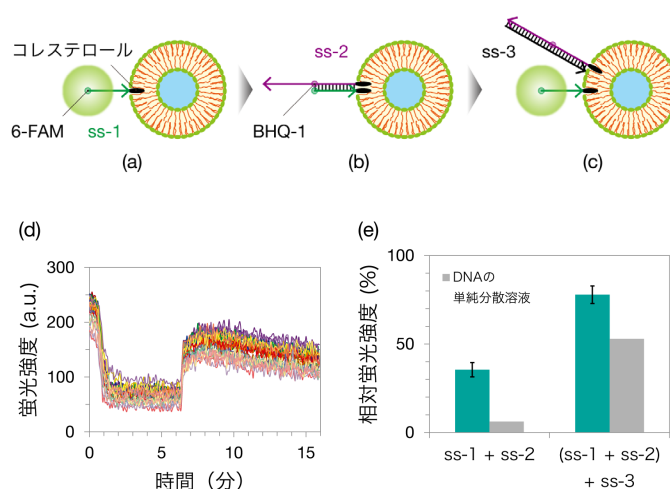


図4: GV膜上における連続的な二重鎖形成反応の模式図(a-c). GV膜上蛍光強度の時間変化(d)と消光状態と回復状態における相対蛍光強度(e).

の実験から、粒径に依存した現象や、連続的な化学刺激に対する応答を明らかにした。従来の GV 研究においては、顕微鏡下でマニピュレーションしながら個々の GV の動態を詳細に追跡すること（単一 GUV 法など）と十分な観測数を得て統計的な解析を行うこと（フローサイトメトリーなど）はトレードオフの関係にあった。対して、本研究で開発した粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスは、その双方の要求を満たす第 3 の GV 解析手法として位置づけられる。さらに、捕捉領域の設計変更により容易にその仕様を拡張できる利点もある。複数の GV が任意の位置や形状で捕捉されるようにトラップの構造を変更することで、精確に制御された個数の GV から成る GV 集団の挙動が解析でき、多細胞モデル構築への足掛かりとなることが期待される。また、GV とトラップ内壁との接着性をうまく制御できれば、接着細胞のモデル構築へつながる研究が期待できる。本手法を用いることで、これまで困難であった複雑な解析が初めて可能になり、GV 研究に新たな視点を与える点で、本研究は大きな意義がある。