

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 風山 祐輝

序

水中で脂質分子が自己集合して形成する袋状の生体膜モデル（ジャイアントベシクル；GV と呼ぶ）の形態変化や化学反応（ここでは動態と定義する）は、細胞動態の有用なモデルとして注目され、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。しかし、分子の自己集合過程が複雑であるために粒径や形状が多分散となり、集団として定量的に GV 動態の解析を行うことは困難を極めていた。これに対し、風山氏の博士論文は、この多分散である GV 集団を、微細加工技術を施したマイクロ流体デバイスに流すことで、球形で均一な粒径の GV 集団を得る手法を開拓し、GV 動態の粒径依存性を定量的に明らかにすることを目指したものである。

論文の概要

第一章では、本研究の背景、目的とその意義が述べられている。第二章では、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結果がまとめられている。粒径選別の手法として風山氏が採用した決定論的横置換法について、その基本原理、および、ポリスチレンビーズや細胞の粒径選別の研究例を概観し、その上で、それらより柔らかい粒子である GV に適用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。このデバイスによって風山氏は、12, 16, 20 μm の 3 種類の標的粒径に対し、いずれも変動係数 12%未満で単分散性のある GV を 67 個以上並列して配置することに成功した。また、曲げ弾性係数に関する実験結果から、実際に捕捉された GV の粒径が設計よりも約 10%大きくなった原因を、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の上昇であると考察した。

第三章では、作製したマイクロ流体デバイスを用いて、連続的な浸透圧刺激に対する GV の形態変化について並列同時観測を行った結果が論じられている。風山氏は、同組成で異なる粒径をもつ 2 種類の GV（標的粒径 12 μm および 20 μm ）に対して、外側の溶液の浸透圧を連続的に上昇降下させた場合に、GV の応答は初期粒径に依存して異なり、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を見出した。また、GV が収縮する際の体積変化から水の膜透過率を算出し、流れ場がない場合のそれと比較して整合することを示した。これにより、デバイスにおける 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ことはあっても、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ないことと結論付けた。

第四章と第五章では、ドメイン形成 GV と DNA 修飾 GV のそれぞれの動態を、マイクロ流体デバイスを用いて同時並列観測した結果を論じた。ドメイン形成 GV の場合、高流量時には、流れ場から受ける力学的ストレスが大きくなり、縞状の脂質ドメインを持つ GV

が多く観察され、低流量時には半球状の脂質ドメインを持つ GV がトラップ内部で回転することがわかった。また、膜結合タンパク質であるアネキシン V を作用させると、低濃度であっても、それに結合する脂質を含む GV が応答して破裂することを見出した。DNA 修飾 GV は、DNA-コレステロール複合分子をリン脂質に混合して作製された。GV 膜上での連続的な DNA の二重鎖形成反応は、同じ膜組成で粒径も均一である GV であっても同様に進行しないことがわかった。この結果を自己相関関数を用いて解析することで、GV 膜上での二重鎖形成反応は個々の GV 膜のマクロな状態の分散の影響を受けてばらつくことを示していると意義づけを行った。

第六章は、以上の研究成果を、GV 動態の観測技術として、光学顕微鏡による個別観測技術およびフローサイトメーターに続く、第 3 の新しい手法であると意義づけ、その汎用性と拡張性をまとめている。

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。

第二章において、GV の粒径選別・配置技術を確立したマイクロ流体デバイスの設計アイデアが高く評価された。一方で、デバイス内の厚み方向の流れ場が GV 捕捉効率に及ぼす影響を明確に議論するべきとのコメントがあり、その後、それらの実験データを掲載して改訂が行われた。

第五章において、脂質の膜組成に依存しうる実験結果が、自己相関関数の解析に基づくマクロな分散で議論するのみならず、分子構造のレベルから解釈できるかに関心が寄せられた。得られた結果をより理解しやすくなるように、解析結果や脂質の構造式に関する詳細を整理してほしいとの要望があり、その改訂がなされている。

風山氏の博士論文は、発見が報告されて以来世界でまだ達成しえてなかった GV の粒径選別・空間配置技術を築き上げ、並列同時観測によって GV 動態の経時的な分散変化を初めて実験的に示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。第二章の内容は新規性が高く、また汎用性の高いマイクロ流体デバイスの設計指針を与えるものとして評価され、本論文の提出者が筆頭著者である原著論文が国際専門誌 *Analytical Chemistry* で受理・公開されている。第三章から第五章の内容についてもそれぞれ論文準備中であり、閲覧頻度の高い専門誌へ投稿される予定である。それぞれ共著者との共同研究であるが、本論文の提出者が主体的に実験・解析・論考を行ったもので、論文提出者の寄与は十分であると判断される。

よって、本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。