

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高橋 慧

序

細胞膜の変形や動きは、細胞が生命体として内部を保持しつつ外部刺激に常に応答する機能を担っている。従来、細胞そのものや細胞サイズの袋状脂質二分子膜を用いて機能解明の研究が行われてきたが、外部から内部への物質や熱の伝達過程が複雑であるために、細胞サイズのスケールで脂質膜-細胞質構成因子の相互作用のキネティクスを詳細に論じるには困難があった。基板上で作製される二次元の脂質展開膜はその解決策となるが、ナノメートルサイズの変形解析にとどまる研究例がほとんどであった。高橋氏の博士論文は、細胞抽出脂質から人工合成脂質までを対象に、基板上の脂質展開膜をマイクロメートルサイズで構築する手法を開拓し、脂質展開膜の細胞サイズの変形を見出し、それを経時的に形態解析することで、三次元に構造変形する細胞膜機能へ構成論的にアプローチ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、細胞抽出脂質を用いた細胞サイズの脂質展開膜作製法の確立についてまとめられている。細胞抽出脂質は様々な脂質分子や脂溶性分子を含む混合物であり、細胞サイズの脂質展開膜を作製する技術は報告例がない。これに対し、高橋氏は半導体作製プロセスの一つであるスピノコート法に着目し、脂質を溶解した有機溶媒の蒸散とスピノコートを組み合わせることで細胞抽出脂質による細胞サイズの脂質展開膜を作製することを目指した。室温で活発にアメーバ運動する *Dictyostelium discoideum* をターゲットに、脂質を溶解する溶媒、蒸散条件やスピノ条件を検討し、 $2.7\sim 3.2\times 10^4\ \mu\text{m}^2$ の表面積で厚み約 $10\ \mu\text{m}$ のパッチ状脂質展開膜を得るに至った。そこで高橋氏は、別途に細胞質を抽出し、脂質展開膜を PBS 処理した後にこの細胞質に添加したところ、10 分間で脂質展開膜が約 2 倍に膨潤するという buckling 変形を見出した。この細胞自身の buckling 変形は、ガラスキャピラリーで細胞膜に局所的に圧力をかけたときの細胞膜応答であり興味もたれる。そこで、変形アメーバ運動の細胞膜の脂質分子に関わるシグナル伝達系の PTEN および PH-crac を蛍光修飾した細胞から抽出した細胞質をこの脂質展開膜に添加すると、buckling 変形は PTEN が膜最表面に、PH-crac が膜内部に局在してゆく過程とカップリングしていることがわかった。PTEN は PH-crac よりも速く脂質展開膜に局在した。この結果は、細胞サイズの buckling 変形がシグナル伝達系の 2 つのタンパク質の膜局在と相関することを初めて見出した *in vitro* 系として興味深いものである。

第三章では、精製された脂質分子を混合した脂質展開膜の作製法とその変形について論じている。精製された脂質分子を混合した脂質展開膜は従来 vesicle rupture 法で作製され、

脂質膜流動性の観点からナノメートルサイズの変形の報告例が大半であった。高橋氏は第二章で観察されたような細胞サイズの膜変形は、細胞質構成因子と脂質膜との相互作用に基づけば、こうした混合脂質の脂質展開膜でも誘起されうると考え、シグナル伝達系の PTEN や PH-crack が関わる脂質分子であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 (PIP2) やホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP3) を配合したフォスファチジルコリンの脂質展開膜を作製する実験法を確立した。この脂質展開膜へ細胞質を添加したところ、フォスファチジルコリンのみの脂質展開膜ではマイクロメートルサイズの膜穿孔が複数個所で誘導されることがわかった。PIP2 や PIP3 を配合した脂質展開膜では、孔サイズが小さくなる傾向が明らかになった。また、基板上の脂質展開膜を起点としたチューブ状構造が形成される条件も見出すことができた。これらの結果は、脂質展開膜の流動性が脂質膜構成因子によって顕著に変化して、膜が歪みやすくなることを示しており、PIP2 や PIP3 はその抑制因子としてはたらくことを示唆するものとして意義がある。

第四章では、人工合成脂質を利用した展開膜の三次元構造化に対して、合成脂質の分子設計とその実装について述べられている。高橋氏は、熱刺激で分子変換される、設計汎用性の高い DNA/RNA を親水基とする新規合成脂質分子を提案した。さらに、その分子を用いて脂質展開膜を作製し、昇温操作のみで三次元分子集合体へ構造変化させることに成功した。この成果は、マイクロメートルサイズにおける脂質膜の三次元構造化に対する DNA を用いたアプローチとして初めての例であり、応用性の高いソフトマター制御法として期待される。

第五章は、以上の研究成果を、生命体の一つの基本的性質であるコンパートメントの構造変形に対する 2次元脂質展開膜からの構成論的アプローチとして意義づけを行っている。

審査結果

この発表を受け審査会では、以下のような質疑討論を行った。

第二章において、従来法では実現されなかった細胞抽出脂質によるマイクロメートルサイズの脂質展開膜を作製できる手法を確立した点が高く評価された。一方で、**buckling** 変形の再現性を明示し細胞運動との関連性を明確に議論するべきとのコメントがあり、その後、再現実験のデータを掲載してそのような改訂が行われた。

第三章において、脂質展開膜の複数個所でマイクロメートルサイズの穿孔が起こる現象の新奇性に関心が寄せられた。この新奇現象の特徴をより理解しやすくするために、孔サイズのみならず孔間隔についても解析して議論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。

第四章において、DNA/RNA を利用した合成脂質の分子設計指針が評価された。特に、天然由来の脂質やこれまでの合成脂質は、親水/疎水バランスなど分子設計段階ではその特性を容易に制御しえないが、親水部に設計汎用性の高い核酸塩基を利用するコンセプトとそれを実装した実験結果は本研究成果の価値を高めている。

全体を通して、本論文で謳われている構成論的アプローチに対して、二次元脂質膜の重要性をより明確に主張してほしいとの前向きなコメントが寄せられた。これについても第一章と第五章で論述を補った。高橋氏の博士論文は、細胞抽出脂質から人工合成脂質までを対象にして、その都度、脂質の特性に応じた脂質展開膜作製法を開拓し、細胞サイズの構造変化を共通して実験的に見出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、マイクロメートルサイズの脂質展開膜構成法の汎用性と、細胞サイズの buckling 変形の発見が評価され、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 **Journal of Biological Engineering** で受理・公開されている。第三章および第四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。