

論文の内容の要旨

論文題目 生細胞の力学特性計測を目的とした光駆動ナノマシンの研究

氏 名 嶋田 直矢

本論文は従来手法では実現できなかった単一細胞の3次元機械特性と細胞骨格タンパク質集団の空間的相互作用を計測可能な以下に示す2つのシステムに関する研究について述べたものである。

1. 細胞機械特性の3次元計測システム
2. 細胞骨格構成タンパク質集合の3次元相互作用計測システム

これらシステムは5~10 μm の細胞と同程度の大きさの微小可動機構である光駆動ナノマシンによる細胞操作・計測技術を基盤としている。

まず、3次元計測システムは光駆動ナノマシンに高さ方向に直径の違う円錐台形状マーカーを用いて、顕微鏡平面像からの細胞機械特性の3次元計測を実現したものである。続いて、3次元相互作用計測システムは、本研究で設計・開発した微小な梁構造を有するナノマシン「光駆動ナノビーム」、およびその計測部位のみにタンパク質を接着させる手法を開発し、細胞骨格タンパク質集団の計測を実現したものである。

本研究では、従来手法では不可能であった細胞の3次元機械特性および、その内部に存在する細胞骨格タンパク質集団の空間的相互作用の計測実現を目指した。これら2つのシステムは既存の光ピンセット系から光学系の変更を一切行わないため、導入が容易な利点を有する。そのため、細胞機械特性計測分野において有用なものとなる。本論文は7章で構成される。以下に本論文について詳細を述べると同時に各章の内容を述べる。

第1章は、まず本研究の背景となるマイクロマシン技術について論じた。その後、近年重要となってきた細胞に関する機械特性計測について必要性と従来の計測手法の問題点について考察した。それを受け、従来手法では実現できなかった単一細胞の機械特性の3次元計測及び細胞骨格構成タンパク質の3次元相互作用の計測を行うシステムの開発を本研究での目的とした。

第2章では、前章で述べた目的のために実際に利用する技術的背景について述べた。まず、従来の細胞機械特性計測手法である光ピンセット法について原理などを詳しく解説した。光ピンセットは、集光したレーザの焦点近傍に透明な微小物を捕捉・操作可能な手法である。細胞の計測・操作を行う際には、一般的にはマイクロビーズをレーザで捕捉・操作することで行っている。力計測の分解能としては、ピコニュートンオーダーであり、本研究に則してはいる。それにもかかわらず、光ピンセット法で課題が解決できない理由は、操作対象がマイクロビーズに限定されるためだと考察し、任意形状の物体を用いて光ピンセットで機械特性が計測可能な手法であれば解決可能であると論じた。そこで解決手法として光駆動ナノマシンを挙げ、その基本的な概念・操作手法・計測原理などについて解説した。光駆動ナノマシンは、サブミクロン分解能を有する2光子ナノ光造形法を用いて作製される任意の形状を持つ5~10 μm の細胞と同程度の大きさの3次元構造物である。このナノマシンは、光ピンセット法により、顕微鏡下の細胞を非接触遠隔操作することが可能である。光ピンセットを駆動源としているため、力計測の分解能はピコニュートンオーダーであり、さらに形状の工夫により様々な計測に応用可能なため今回の問題解決に適していると論じた。

第3章では、1章で提示した問題の1つである3次元で細胞の機械特性を計測するシステムの構築について論じた。まず、細胞の機械特性を3次元計測する必要性についてさらに詳細に述べた。そして、現在細胞などの微小物を3次元観察するために使用されている手法を応用する形で3次元力計測が実現可能であるかについて検討した。その結果、新たな手法が必要であると論じ、光駆動ナノマシンを用いて顕微鏡下の単一生細胞の機械特性を3次元で計測するための新規システムを提案した。これには、光駆動ナノマシンの作製手法である2光子ナノ光造形法の利点を生かし、高さ方向に直径の変わる円錐台形状の蛍光マーカを用いる。このマーカをナノマシン上の3か所に設置することで3次元位置姿勢を取得し、そこから3次元で力計測を行う。この手法を実現すべく、円錐台形状のマーカの試作・校正を行った。試作した円錐台マーカは底面の直径が1 μm 、上面の直径が2 μm 、高さが3 μm となっている。校正の結果、顕微鏡画像上では、底面から上面までの変化率が0.20 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ であることが分かった。また、マーカは蛍光色素を含んでいるため、退色の影響に関しても計測を行った。その結果、校正した変化率は1時間経過しても変化が見られないことが分かった。この結果を受けて、実際に3次元計測システムを構築した。その際に高さ方向の力の校正に使用したシミュレーションについても本報で言及している。

第4章では、構築した3次元計測システムについて、2種の実証実験を行った。まず、円錐台マーカを用いた光駆動ナノマシンの3次元姿勢を正確に取得可能か、2種類のナノマシンを用いて検証した。その結果、ナノマシンが25°以上傾いたとき、実際のナノマシンと3次元イメージとの間にずれが生じることが考察より明らかにした。これは、平面像からマーカの直径を計測しているため、マーカが傾いた際には断面が楕円状に観察

されるためである。そのため、実際にナノマシンで計測を行う際には、傾きによる断面直径のずれがカメラのサブピクセル以内に収まれば誤差の範囲に収まる。このことを、実際の計測を行うナノマシンに反映し、イースト細胞の圧縮による検証実験を行った。その結果、3次元的に力計測を行うことに成功した。また、ナノマシンが細胞に乗り上げていることが実験のようすから判明した。これは、従来の手法では検知不可能であり、本手法の有用性を示した。

第5章では、1章で提示した問題のもう一方である低粘度溶液内で細胞骨格タンパク質の3次元的な相互作用を機械特性として計測するシステムについて論じた。まず、細胞骨格タンパク質の空間的相互作用の計測の必要性およびそれにかかわる先行研究について詳細に述べた。そこから、本研究の目的とした計測を実現するための要件を考察し、新たな光駆動ナノマシンとして“光駆動ナノビーム”の設計・開発を行った。このナノビームはガラス基板に接着したベース部から伸びた長さ20 μm の微小梁構造の先端にプレートを持している。さらに、そのプレートの対面には同じサイズのガラス基板に接着した壁がある。壁とプレート間のタンパク質集合体の弾性を準静的に計測することが可能である。

このナノビームでの計測を実現するため、梁弾性の校正及び所望箇所へのタンパク質の吸着手法について検討を行った。まず、梁の弾性の校正について述べる。光駆動ナノビームを用いて計測した結果にはその構造上梁の機械特性も含まれる。そのため、梁の機械特性を実際に計測する手法が必要である。そこで、ナノビームの梁と同じ梁の先端に質量既知のガラスビーズを取り付けたものをガラス基板上に用意し、基盤を徐々に傾けながらビーズの重さで梁をたわませ、その変位から弾性を計測する手法を用いてそれを校正した。続いて、ナノビームの所望箇所のみタンパク質を接着する手法を考案した。これは、壁とプレートのみを造形後表面にアミノ基を有する光硬化性樹脂を用いて作製し、その表面に架橋剤を用いてN-ヒドロキシコハク酸イミドエステルを修飾することで、タンパク質表面のアミノ基と結合させることで実現している。この手法の検証のために、通常樹脂とアミノ基を有する樹脂でそれぞれ一辺10 μm の四角柱形状の試験片を作製した。その結果、界面活性剤によるタンパク質の非特異的結合の阻害処理を行った後に、アミノ基を有する樹脂のみにタンパク質が吸着する様子が確認できた。それぞれの成果をうけ、ナノビームを用いた計測が実現可能なものとなった。

第6章では、開発したナノビームで実際に細胞骨格構成タンパク質であるアクチンフィラメントの計測した。アクチンフィラメントは、細胞内タンパク質の集合体である細胞骨格の主成分として知られ、その弾性計測は細胞骨格を模擬するために広く計測されている。そのため、アクチンフィラメントの計測が実証できれば、その有用性を示せる。実験では作製したナノビームが設置された溶液内にアクチンを懸濁し、その後のプレート振幅の変化を観察した。実験前では計測開始時からアクチンがプレート・壁双方の間をつなぎ、機械刺激に応じてその硬さを変化させる様子を捉えられると考えていた。し

かし計測の結果、計測の初期段階ではプレートと壁の表面のみにタンパク質が存在し、双方はつながっておらず、あるタイミングでタンパク質を介して双方がつながる様子が観察された。また、壁・プレートが結合したのちに準静的な引張試験を行った結果、アクチンの弾性は他の文献よりも非常に小さい値を得た。このことから、本計測システムでは当初の目的どおりタンパク質集合の空間的な相互作用を得たと考えられる。この結果は、今後さらなる検証実験で検証する必要があるものの、本システムの一定の有用性を示した。

第7章は、構築した2つのシステムの特徴と有用性、システムの課題、今後の展望を述べた。両システムに共通することとしては、ナノマシンの駆動源である光ピンセットの光学系を一切変更することなく従来行えなかった計測を実現している。近年では光ピンセット光学系は顕微鏡の周辺機器として購入可能である。そのため、これらの様な光学系の変更なしで行える計測手法の有用性は高い。

また、本実験は従来手法では実現不可能である計測をそれぞれのシステムで実演していることが細胞生物学分野で昨今重要視されている細胞・タンパク質の機械特性計測において有用であるとして、本論文を結論づけた。