

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 綾野 賢

本論文は、1細胞レベルでの世代間での細胞の動的状態の比較解析、タンパク質の発現解析などから、細胞の持つ動的状態が世代間でどこまで伝承されるかを明らかにすることを旨とした研究であり、このために微細加工技術によって構築された大腸菌 1細胞の運動方向を制御する細胞培養システムと、連続計測システムを組み合わせ、細胞のタンブリング頻度の世代間での伝承、変化ならびに、これらに関連した一連の研究を詳細に計測して報告したものである。

第1章では、本研究の背景と目的、本論文の構成を述べている。まず、本研究の背景として、同じ遺伝型・表現型を持つ細胞が持つ挙動の揺らぎの由来、1細胞計測が可能とする機能計測についての説明、1細胞レベルでの機能解析によって細胞の運動特性などの機能について世代をまたがって理解することの必要性について述べている。

第2章では、1細胞とその子孫細胞の表現型を直接比較観察するために用いた「オンチップ 1細胞培養システム」の詳細について述べている。このシステムは大別して四つの要素技術からなっており、(1) マイクロチャンバとよばれる微細加工技術によって作成された構造物が細胞観察用のスライドガラスにアレイ状に並んだ「マイクロチャンバアレイ基板」、(2) 培地成分や温度などを制御しながら顕微鏡下で細胞を長期間培養することができる「連続培養システム」、(3) 細胞の状態を画像データとしてとりこむ「画像取得部」、(4) 細胞を非接触にトラップして操作する「光ピンセット」、以上四つの要素技術について、その性能が要求するものに見合うかどうか、どのような攪乱要素があるかなどについて評価・検討を行っている。特に、光ピンセットについては姉妹細胞の成長速度・分裂時間の相同性という知見を利用して細胞への影響を見積もっており、その結果は、細胞へダメージを与えることなく操作する場合、3mW のレーザー強度で 1.5 分以内、あるいは 6mW のレーザーパワーで 30 秒以内のトラップという条件で行うことが望ましいというものであった。また逆に 20mW 以上のレーザー強度、あるいは 10 分以上のトラップによって細胞の成長・分裂を人為的に停止させることもできることも報告している。

第3章では、たとえ同一環境下で同一の遺伝子を持つ集団であっても各個体で異なっている大腸菌のタンブリングと呼ばれる方向転換と直進を繰り返しながら溶液中を移動する運動特性に着目して、タンブリング頻度のばらつきという個性が次の世代に及ぼす影響、世代間での特性の伝承について検討を行った結果について述べている。ドライエッチング法によって作成した幅 1.5・m、深さ 1.0・m、長さ 5mm の溝を用いて、大腸菌の運動を 1次元的に制御し計測を行った結果、細胞は固有の方向転換頻度を持っていることがわかり、またその方向転換頻度は分裂によって生じた二つの姉妹細胞にも等しく継承されていることがわかったことが報告されている。

第4章では、桿菌の細胞の極性(非対称性)は非遺伝的な表現型のひとつであると考え、大腸菌の持つ二つの極を常に区別しながら観察し続けることができる溝状マイクロチャンバレイ基板を用いて、細胞の運動方向の偏りと、それが次の世代にどのように影響するのかということについて計測した結果について述べている。実験結果には、大腸菌の進行方向はときに偏りをしめすが、その度合いは進行方向がランダムに決定されているとした場合起こりえないほどのものであること、実際にタンブリング後の進行方向選択には偏りが見られ、その偏りは分裂によって大きくなる傾向があること、また分裂によって運動能を失う細胞も見られたこと、運動能を失った細胞も成長・分裂に関しては正常であったことなどが報告されている。

第5章では、順応の実験として、大腸菌が誘引物質の濃度が増加するとタンブリング頻度を低下させ、直進する時間が長くなるが、誘引物質濃度が保たれていても、一定時間経過後またもとのタンブリング頻度へと戻るときの順応の特性について、溝状マイクロチャンバを用いて大腸菌の直進時間を計測し、さらにアスパラギン酸(誘引物質)刺激に対する大腸菌の応答を解析している。その結果同じ刺激に対しても細胞によって応答時間は異なり、応答時間は方向転換頻度(タンブリング頻度)と相関があることが示唆され、姉妹細胞で誘引物質応答時間は若干異なっていたが、濃度増加に対する応答時間の増加傾向で見ると姉妹細胞はよく似た傾向を示されることが報告されている。

第6章では、大腸菌の走化性に関わるタンパク質 Tar(アスパラギン酸受容体)の局在に着目し、GFP 標識された Tar タンパク質の細胞極における局在の様子について、細胞の「古い極」と「新しい極」の細胞の機能発現の非対称性の可能性についての解析の結果を述べている。実験に用いたマイクロチャンバレイ基板はウェットエッチング法を用いて作成し、実験の結果 Tar-GFP は分裂直後の偏りを解消するように新しい極へより多く集まることが報告されている。

第7章では、本研究の成果を総括し、本研究のまとめと結論、今後の展望を述べている。本研究の主題である、1細胞の特性の世代間での伝承、環境要因の細胞内への刷り込みの結果などについて、総合的に討論し、遺伝子まで戻らなくても多くの情報が個性として世代間で伝承されているという結論が述べられている。

これら本論文で述べられている研究成果は、従来困難であった「1細胞」レベルでの親子間、姉妹間での細胞の動的特性の変化、継承を明らかにすることを試みた世界でも初の試みであり、また、そのデータの信憑性を保証するために、多くの環境要因の影響についても検証を行っている。特に、タンブリング頻度が親子間で同様な傾向を示していることは、特定の細胞の直系子孫細胞を同定することが必須であり、マイクロ加工技術を巧みに利用して行った本研究は、生命科学の課題を最先端の工学技術で解決することを試みたものであり、その結果は独創的なもので特記に値する。

いずれの研究内容も従来の細胞培養技術では実現できない「1細胞の運動機能計測」を世界で初めて成功したものであり、オリジナルである。また、このような状態観察の結果を世

代間の比較にまで拡張した研究は、新たな生物学の研究手法を提案するものであり、このこと自体が、その研究水準の高さを示すものと考えられる。

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。