

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 夏目 ゆうの

序

細胞内では、生体高分子が細胞容積に対して 5 – 40 vol% でひしめきあっており、それによりタンパク質等の高次構造形成という機能が発現することが近年明らかになってきている。この機能発現はエントロピックな作用に起因しており、そのような作用が“こみあい効果”と呼ばれ注目されている。しかし、細胞変形自体を“こみあい効果”の観点でとらえる研究報告例はこれまでなかった。夏目君の博士論文は、細胞膜に近い構造であり変形可能な袋状の脂質二分子膜（ジャイアントベシクル；GV）をモデルとして用いることで、細胞変形におけるこみあい効果に構成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、目的とその意義について述べている。第二章では、ポリスチレンビーズ（コロイド粒子）を様々な体積分率で閉じ込めた GV の作製法の確立について述べている。脂質二分子膜の薄膜を膨潤して GV を作製する従来法では、体積分率の異なるコロイド粒子内包型 GV を同一条件で調製することは困難である。そこで夏目君は、油中水滴エマルションと水油界面上の単分子膜の利用に着目し、コロイド粒子を細胞内と同程度に高い体積分率で内包した GV を作製することを目指した。油中水滴エマルションの液滴と油相の比重差を利用して遠心力で GV を作製することから、液滴、コロイド粒子および GV 分散液の比重に基づいて作製条件を検討し、0 – 45 vol% の体積分率でコロイド粒子を内包した GV を得るに至った。本研究で確立された GV 作製法は、高い体積分率で高分子や粒子が共存すると、脂質二分子膜は GV を形成せずに凝集するという不安定なソフトマター複合系に対し、GV の内膜と外膜に対応するように油中水滴エマルションと単分子膜を利用してコロイド粒子内包型 GV を形成した初めての例として興味深い。

第三章では、コロイド粒子内包型 GV の変形と内部コロイド粒子の分散状態の関係について論じている。GV 膜が弾性膜として振舞うように糖の高張液を添加し、コロイド粒子内包型 GV の形態の経時変化を観察したところ、コロイド粒子内包型 GV の変形挙動が内部コロイド粒子の分散状態に依存することを見出した。第一に、変形時間の特徴として、コロイド粒子内包型 GV は高張液添加後 100 分以上かけてエネルギー的に安定な形状へ変形する間に、準安定な形状を 30 分以上保持することがわかった。蛍光コロイド粒子を用いた画像相関法によって、GV 内部のコロイド粒子の速さ分布を調べたところ、GV に閉じ込められていないコロイド粒子のそれよりも 0 を中心に先鋭であったことから、GV 内部ではコロイド粒子の運動が抑えられていることが明らかになった。ゆえに、コロイド粒子の運動の速さが GV 膜の変形のそれよりも小さいために、GV の準安定な形状から安定な形状へのエネルギー緩和過程の時間が、コロイド粒子の運動によって引き伸ばされることが示唆さ

れた。第二に、11–13 vol%という特定の体積分率のコロイド粒子内包型 GV は、準安定形状として角張ったポリゴン様の構造を呈することを見出した。GV 内部の一部のコロイド粒子が、残りのコロイド粒子の並進エントロピーを増すように凝集するという相転移が起こり、凝集したコロイド粒子群が GV 膜を裏打ちすることで、GV 膜がポリゴン様の構造へ変形したと考察される。内包したコロイド粒子の並進エントロピー増加というこみあい効果が、膜変形を誘起することを示した点で、本研究成果の意義は大きい。

第四章では、GV 内部のコロイド粒子の分散状態を制御し、不均一な分散状態に対する膜の応答を明らかにする研究の要素技術の構築について述べている。GV 内部のコロイド粒子を操作可能な光ピンセット法に着目し、GV 膜を不安定化せずに内部のコロイド粒子 1 個をレーザー光の輻射圧で捕捉する光学条件を確立した。この条件において、他のコロイド粒子がレーザー光から非対称な輻射圧を受けることで、GV 内部で集団化することを見出した。この成果は、GV 膜に与える影響を抑えながら外部からコロイド粒子の分散状態を制御した初めての例であり、応用性の高いソフトマター複合系の制御法として期待される。

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、コロイド粒子内包型 GV の体積分率について、従来法では実現されなかった目標値を達成できる作製法を確立した点が高く評価された。そして、本作製法を汎用する場合として、タンパク質などの生体高分子を閉じ込める際に、どの条件を最適化すべきか討論を行い、比重差に着眼した工夫点としてコロイド粒子表面に生体高分子を担持する手法などを挙げた。一方で、コロイド粒子の体積分率を導出する際、蛍光コロイド粒子の個数の計測法に対する信頼性を評価するべきとのコメントがあり、その後ポアソン分布に基づく信頼性の評価をもとに論文の改訂がなされている。

第三章において、弾性膜としてふるまう GV 膜が角張ったポリゴン様の構造へ変形する、という現象の新奇性に高い関心が寄せられた。この新奇現象は特定の体積分率のコロイド粒子内包型 GV でのみ見出されたことから、GV 変形を顕微鏡下で探究する申請者としての高い能力を示すものと言える。理論面で理解しやすくするために、コロイド粒子内包型 GV の変形に関する自由エネルギーとそのオーダーについての議論を整理してほしいとの要望があり、すぐに改訂がなされている。

第四章において、コロイド粒子のエントロピックな作用による GV 膜の変形を、直接観察できる要素技術を確立した点が評価された。特に、本研究で作製したコロイド粒子内包型 GV の特性が光ピンセット法に適合するという着眼点と、内部のコロイド粒子を集団化させる条件を見出すことができた点が相乗的に本研究成果の価値を高めている。

全体を通した前向きなコメントとして、本論文は、細胞内におけるこみあい効果の本質を細胞全体で理解するための構成的アプローチの重要な研究として位置づけられる。細胞膜に近い変形可能な膜を用いてこみあい効果を導いた先駆的な研究例であるので、GV 内部

の個々のコロイド粒子の運動の詳細を実験的に明らかにできれば、従来にない新しいソフトマター複合系の細胞変形モデルという意義をより深めることができるだろう、とのコメントがあった。

夏目君の博士論文は、細胞内の高次機能のみならず細胞変形の機構にもこみあい効果を示唆する実験モデルを提案するものとして先駆的な研究を論じたものである。これまで、マイクロメートルスケールの柔軟な閉空間に高い体積分率で微粒子を閉じ込める手法を確立することが難しいという実験上の障壁があったために、このような研究は十分になされていなかった。夏目君は、GV 作製法の原理に立ち返って課題を設定しクリアしてゆくことで、変形可能な脂質二分子膜に高い体積分率でポリスチレンビーズを内包する技術を確立し、そのような単純な構造のソフトマター複合系において、エントロピックな効果に基づく膜変形機構を見出すことができた。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 2 章の内容は新規性が高く、様々な高分子や微粒子を高い体積分率で内包しうる汎用性の高い GV 作製法であると評価され、本論文の提出者が筆頭著者である原著論文が日本化学会速報誌 **Chemistry Letters** に受理されている。第 3 章および第 4 章の内容については論文執筆中である。コロイド粒子の運動状態に関する測定データを踏まえて、微粒子の自由体積空間の増大に基づいたエントロピックな作用の普遍則にアプローチするという特色をもつ実験モデルとしてまとめられ、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・考察を行ったもので、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。