

博士学位論文審査要旨

2020年1月11日

論文題目: Autonomous appearance of dynamic motility and cell-like structure:
Physico-chemical modeling

生命体の動的運動挙動・細胞様構造の自発的創成: 物理化学モデルによる研究

学位申請者: 作田 浩輝

審査委員:

主査:	生命医科学研究科	教授	廣安 知之
副査:	生命医科学部	准教授	貞包 浩一朗
副査:	三重大学大学院工学研究科	准教授	湊元 幹太

要 旨:

生体内の細胞の内外はタンパク質やDNA、RNA等の生体高分子が重量濃度にして30~40%を占める環境である。それらの分子はnmスケールで顕著な熱揺らぎにさらされているが、そのような環境を活用して数百nm~数 μm の大きさの細胞内器官や核、さらにはそれよりも大きな細胞や組織体、生物個体を自己組織的に形成し、同時に生体機能を高度に制御する。しかしながら、そのメカニズムの本質は、未だ多くが明らかにされていない。

本学位論文は、生体分子が作り出す細胞の構造の形成と生体機能として細胞や組織体の運動挙動について物理化学的な実験モデルを創出することにより、そのメカニズムを解明することを目的として研究を行った結果をまとめたものとなっており、全体としては9章からなっている(第1、9章は各々、General Introduction, General Conclusion)。第2章では、高分子の混雑によって生じる細胞サイズのマイクロ液滴を細胞環境と見立てて生体分子を混合することで人工的に細胞の構造を再構築するモデルの創出に取り組んだ。細胞膜を構成するリン脂質や、DNA等を混合した際にDNAが液滴の内部に内包され、加えて、液滴の表面に膜状の構造を形成するという結果を見出した。第3章では、このような高分子の混雑により生じるマイクロ液滴を用いて細胞集団の立体的な配置による組織的な形成の可能性が示唆された。細胞内および、細胞間の構造の形成のメカニズムに関して高分子の混雑が大きく寄与しているものであることを明らかにした。

生体の運動挙動について上述の高分子の混雑により生じるマイクロ液滴内での運動タンパク質の運動系に加えて、非生体由来の物質による人工モデル系として界面張力の変化により生じる運動系を取り扱い、その創出を行った。第4章では、運動タンパク質であるキネシン-微小管が細胞サイズのマイクロ液滴の内部で対流等の規則運動を行うことを見出した。細胞内での運動タンパク質の動態を明らかにする重要な寄与を果たすと考えられる。第5章から第8章では、非生体由来の物質を用いた運動系では化学物質に反応して運動する走化性や複数個体の運動の同期性が生じることを見出し、理論モデルを用いてメカニズムを提案した。

これらの成果は、生命におけるnmスケールの生体分子が作り出す細胞の構造の形成と運動挙動の創出と制御について、そのメカニズムを明らかにする新規な知見を与えるものとなっている。よって、本論文は、博士(工学)(同志社大学)の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2020年1月11日

論文題目: **Autonomous appearance of dynamic motility and cell-like structure:
Physico-chemical modeling**

生命体の動的運動挙動・細胞様構造の自発的創成: 物理化学モデルによる研究

学位申請者: 作田 浩輝

審査委員:

主査:	生命医科学研究科	教授	廣安 知之
副査:	生命医科学部	准教授	貞包 浩一郎
副査:	三重大学大学院工学研究科	准教授	湊元 幹太

要 旨:

本論文提出者は、2017年4月より本学大学院生命医科学研究科博士課程（後期課程）に在学している。併せて本学リサーチ・アシスタント、日本学術振興会特別研究員（DC2）に就任しており、各年度において優れた研究成果を挙げている。また、本研究科修了に必要な所定の単位を修得するとともに、英語の語学試験にも合格しその能力が十分であることが認定されている。

本論文の主要部分は、Applied Physics Letters（2016年掲載）、The Journal of Physical Chemistry Letters（2018年掲載）、Frontiers in Chemistry（2019年掲載）に提出者が筆頭著者として掲載済みとなっている。さらに、ICBP-IUPAP Biophysics Congress等の国際会議や国内学会で発表し、高い評価を得ている。

2020年1月11日15時より約1時間にわたり提出論文に関する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され、提出者の講演とそれに引き続き活発な質疑応答がなされた。提出者の説明により研究内容が学問的に優れていることを審査委員一同が確認した。公聴会終了後、提出論文に関係した学問的諸問題について、審査委員による口頭試問を実施し、提出者が博士学位授与にふさわしい能力を有することを確認した。よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： **Autonomous appearance of dynamic motility and cell-like structure: Physico-chemical modeling**

生命体の動的運動挙動・細胞様構造の自発的創成：物理化学モデルによる研究

氏名： 作田 浩輝

要旨：

生体内の細胞の内外はタンパク質や DNA、RNA などの生体高分子で非常に混雑しており重量濃度にして、30~40%の高分子が溶解した環境である。また、生体分子はその多くは nm スケールの大きさで個々の分子は顕著な熱ゆらぎにさらされている。そのような環境下で生物は、数百 nm ~ 数 μm スケールの大きさの核や細胞内器官、数十 ~ 数百 μm スケールの細胞や組織体の構造の形成を生体分子から自己組織的に行うことを可能にしている。しかしながら、そのメカニズムの本質は未だ解明されていないことが多く残されている。

生体分子による生体機能の制御として、生物の運動性についても本質は大部分が未解明である。生物は化学エネルギーから力学的な仕事を nm スケールの運動タンパク質により取り出しており、その集合体や生物個体は μm ~ m スケールのマクロな方向性を持った運動を取り出している。ここで、いかに nm スケールの運動タンパク質が μm ~ m スケールのマクロな運動を取り出すことができるのか、その本質は未だ明らかになっていないことが多く、人類はその技術応用を行うこともできていない。人類の有する代表的なエネルギー変換の技術は熱機関であるが、Carnot cycleに見られるような断熱条件下で熱勾配を作り出すことが運動を取り出すために必須である。生物は非平衡等温条件下で化学エネルギーから力学的な仕事を取り出すことを可能にしており、人類の有する従来の技術とは根本的に異なる。等温条件下で nm スケールの分子を用いてマクロなスケールの力学的仕事を取り出すメカニズムを明らかにすることが重要である。

本論文では、nm スケールの生体分子が作り出す細胞の構造の形成と運動挙動の創出と制御について物理化学的な実験モデルにより、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。論文は9章でまとめ、第1部を細胞の構造形成に関する研究、第2部を運動挙動の創出と制御に関する研究として2部構成でまとめた。以下に各章の記載内容について概説する。

第1章では、本論文全体の序論として、研究の背景を紹介し、細胞の構造の形成と運動挙動の創出と制御における基礎的な物性と理論を述べるとともに、研究の目的を紹介した。

第1部は、第2章と第3章からなる。細胞の構造の形成のメカニズムについて着目し、人工的に細胞環境を模したモデル実験系に対して、生体由来の分子を導入することで細胞の構造の自己組織化を行う再構築モデル実験系の創出、および、メカニズムの解明を行うことで、生体内での生体分子の自己組織的な構造形成のメカニズムの解明に取り組んだ結果を記した。

第2章では、高分子の混雑環境において生じる細胞サイズの微小液滴を細胞のモデルとして、細胞膜を構成する分子であるリン脂質を導入することにより細胞膜の構造が再構成できるモデル実験系の創出を試みた。これまでの研究で著者らは、人工の水溶性高分子である polyethylene glycol (以下、PEG) と dextran (以下、DEX) を混合した溶液で、高分子が各相に分かれて 10 ~ 100 μm の細胞サイズの微小液滴を形成することを明らかにしてきた。さらに、そのような液滴の形成する濃度条件の下、DNA や細胞骨格を形成するアクチンを混合すると液滴内部に自発的に局在することを見出してきている。本章では、微小液滴を形成する高分子溶液に対し、細胞膜を形成するリン脂質を導入した場合に膜状の構造が液滴の表面に再構成することを見出し、そ

の結果を記した。さらに、リン脂質と DNA を合わせて導入した場合には、DNA が液滴の内部に局在し、その液滴がリン脂質の膜構造によって被覆される、細胞様の構造が形成されることを見出した。

第 3 章では、上述の高分子混雑により生じる微小液滴を用いることで、細胞間の構造の形成の可能性が示唆された研究結果を記した。PEG と DEX からなる高分子水溶液に対して、赤血球や乳腺由来の上皮細胞を混合した場合にそれらの細胞は、DEX-rich な液滴に自発的に局在することを見出した。さらに、PEG と DEX の組成を変えた場合に細胞の液滴内での配置が界面付近と液滴の内部で操作が可能であることを見出した。さらに、配置は細胞種により異なり、赤血球と上皮細胞ではそれぞれ、界面付近と内部で逆の配置を取ることが明らかとなった。細胞種ごとの液滴内部への立体配置を行うことで、高分子溶液への混合により細胞の 3 次元組み立ての基礎技術としても発展の可能性があると考えられる。

第 2 部は、第 4 章から第 8 章までの 5 章からなる。生命体の行う機能の制御として $\mu\text{m} \sim \text{m}$ スケールの組織体のマクロな運動性に注目した。生物由来の分子による再構成モデル実験系や非生物由来の分子による人工モデル実験系を創出し、メカニズムの解明を行うことで、生命体の運動挙動の創出と制御についてメカニズムの解明に取り組んだ結果を記した。

第 4 章では、上述の微小液滴系を用いて、生体由来の運動タンパク質であるキネシンと微小管を導入した際に、液滴内部で渦状の対流が生じるなどの規則運動が生じる結果を記した。PEG と DEX の混合溶液にキネシン、微小管を導入すると、DEX-rich の液滴の内部に自発的に局在する。さらに、キネシンが微小管に沿って運動する際にエネルギー源とする ATP (アデノシン三リン酸) を加えると、液滴内部でキネシンと微小管のネットワークが形成され対流を形成することを見出した。対流は、液滴の大きさや、液滴内部に局在するキネシンと微小管の比率によりその様態を変え、渦状の対流など異なる運動モードが現れることを見出した。細胞内部の流動などの運動性のメカニズムの解明に寄与するモデル系であると考えられる。

第 5 章では、非生物由来の分子で生物の運動に似た性質を示す、人工モデルの創出を試みた。水中や水面上に存在する油脂の液滴が自発的な運動性を示すことは、20 数年前から明らかとなってきた。液滴を構成する分子が界面活性を示す物質で、空間特異的にそれらの物質が拡散するとき界面張力の勾配が生じ、それに伴い生じる Marangoni 流により液滴が運動性を示す。本章では、生物が化学物質に対して逃避もしくは誘因的に運動する走化性について着目しモデル実験系の創出を試みた。水面上に浮かべたオレイン酸の液滴に対して、アンモニアの揮発ガスを与えた場合にオレイン酸の液滴はガスから逃避方向へ運動することを見出した。これは、酸 - 塩基反応により、界面活性を示す物質が空間特異的に配向し、界面張力の空間勾配を作り出すことにより運動が生じると考えられる。同様の実験系でアニリンの液滴を水面上に浮かべ塩酸の揮発ガスを与えた場合には、液滴はガスへ誘引される方向に運動することも確認した。

第 6 章では、水面上を運動する液滴の同期性に着目した研究結果を記した。幅 1cm の細長い流路にニトロベンゼンの液滴を滴下した際に液滴は、流路内を往復運動する。この時、流路内に液滴を 2 つ配置し、ガラス棒により流路を 2 つに分けた際には 2 つの流路でそれぞれ往復運動を行う液滴が同期して往復運動を行うことを見出した。同期は 1:1 や 2:1 と流路の長さを変えた場合にも生じることを見出している。運動を行う個体が集団となった場合に、個体間に働く相互作用が集団での運動にいかに関与するかを明らかにする基礎的な実験モデルとなると考えられる。非線形振動を示す微分方程式を用いて、液滴間の相互作用項を導入することにより数理モデルからもメカニズムの解明を行った。

第 7 章では、界面張力の空間的な勾配により駆動する実験モデル系としてより簡素化した実験系を用いた、形状や境界条件の寄与に関する研究結果を示した。水面上に浮かべられた、金属片に対して可視光レーザを照射した際には、レーザ光が吸光され局所的な温度上昇が生じる。界面張力は温度によっても変化するため、局所加熱により Marangoni 流が生じて金属片は運動を行

う。金属片をハンマー型の形状とし容器の壁に近接させレーザー光を照射した場合には、ハンマー型の金属片はレーザー光の照射位置付近を往復する振り子状の振動運動をすることを見出した。金属片に働く力の運動方程式から振動のメカニズムについて数理モデルによる考察も行った。さらに、金属片をオレイン酸の液滴により被覆しレーザー光を照射した場合には、金属片はオレイン酸の液滴の内部で公転運動をすることも見出した。

第8章では、これまでの研究結果で、境界条件や外的もしくは自発的要因による対称性の破れがマクロなスケールでの方向性を持った運動の創出に重要な寄与を果たす知見が得られたため、より簡素な実験系を用いたモデル実験の創出を試みた。水および有機化合物のトリエチルアミン（以下、TEA）を相分離する濃度の臨界点近傍で混合したときに TEA-rich の溶液に対して、近赤外のレーザー光を照射したときに溶液中にわずかに残存する水がレーザー光の電場により相分離し水滴の湧き出しが生じる。このとき、場の非対称性として容器の深さを変えると、湧き出し流が深い方向への一方向流となる。流体に関する数理モデルからも検討を行うことにより場の非対称性の運動に関する寄与を明らかにした。

第9章では、結論として本論文における研究成果を報告し、有用性や将来の発展性について記した。

以上の結果より、生命における nm スケールの生体分子が作り出す細胞の構造の形成と運動挙動の創出と制御について、物理化学的な実験モデルを用いることで、そのメカニズムの一端を明らかにすることができたと考えられる。複雑で複数の働きを示す生体分子の動態について物理化学的な実験モデルを創出しメカニズムにアプローチすることが今後の学問の発展においても極めて重要な方法論であることが示されたと考えられる。