

論文審査の要旨及び担当者

論文題名

3次元位置検出顕微鏡と光ピンセットを用いた 外力下での単離マウス気管繊毛先端の軌跡の解析

論文審査の要旨

1. 論文の概要、および内容の評価

本論文は、真核生物に共通する特徴的な小器官である「繊毛」に注目し、顕微計測によってその基礎研究に新しい視点を与えるものである。

繊毛は長さがミクロンオーダーから長いもので $10\mu\text{m}$ 、直径はどれもほぼ $0.2\mu\text{m}$ であり、種や器官によってさまざまなバリエーションが知られている。高等生物の脳室、輸卵管をはじめ、さまざまな生物種のさまざまな細胞で重要な役割を担っている。著者の研究では哺乳類の気管の細胞にある動繊毛を扱った。この動繊毛の役割は、集団で規則的な運動を繰り返し、異物を肺から喉頭へ押し流す粘液の流れを産み出すことである。一個の上皮細胞には200本近い繊毛が生えており、これらのはたらきによって哺乳類の肺の中は無菌に保たれている。

本論文の主題となっている実験では、この繊毛の運動の仕組みを理解すべく、繊毛一本を観察対象にしている。その先端部の運動を詳細に計測する実験系を構築し、さらに「光ピンセット」によって繊毛の片端をバネ的に捕捉したときの繊毛の応答を得ることにも成功した。

第一章は序論であり、繊毛（あるいは鞭毛）の一般的な説明を行い、基本的な構造・種類・多彩な機能について触れている。

哺乳類の気管は、体に有害な塵や病原菌といった物質に常にさらされており、これらの異物を押し流すための仕組みとして肺から喉頭へ向けた粘液の流れが存在する。この粘液流を生み出しているのが『繊毛』と呼ばれる気管表面に生えている小さな毛である。気管上皮には1細胞に200本近い繊毛が生えていて、これら無数の気管繊毛のはたらきによって、私たちの肺の中が無菌に保たれている。

この繊毛は細胞から突き出た数 μm 、直径約200nmの毛のような細胞小器官で、気管だけでなく、脳室、輸卵管をはじめ、さまざまな生物種のさまざまな細胞に存在する。そしてこれらの繊毛は、繊毛打と呼ばれる波打つような動きにより細胞表面に水流を作ったり、繊毛打の生

み出す推進力を用いて溶液中を遊泳したりする。そして特に、この繊毛打は自己調整を受けていることが知られている。繊毛の動きは、繊毛内部に存在する数千もの分子モーターである『ダイニン』が、制御されて局所的に・順番に協調して力発生を行うことにより実現されていると考えられている。ここで、繊毛を細胞から単離したうえで、一部の重要なタンパク質だけを残した状態でも、このダイニンの制御が行われて繊毛打が維持される。これは自律的に複雑な波打ち運動を行うことができる、高度なメカニズムがその構造に内部に存在することを示唆する。

では、繊毛はどのようにして粘液流を生み出しているのか。棒を前後に動かしただけでは流れが起きないように、剛体の単純な往復運動では一方向性の動きを生み出せないことが指摘されている。気管繊毛は『有効打』と『回復打』から構成される繊毛打を行うが、『有効打』のフェーズでは繊毛の先端が高い位置を、『回復打』のフェーズでは低い位置を通過することにより、行きと帰りの対称性が破られて一方向性の流れが生み出されることが定性的には示されている。本研究では、この繊毛先端の高さ方向の違いとして特徴づけられる非対称性の精密な定量化を行った。通常の顕微鏡では2次元の観察しか行えないために、有効打と回復打で高さが異なるこの3次元的な運動を、実際の溶液中で正確に記録することは困難である。特に、生体内を模した高粘度環境下でどのような形状変化を行うのかは良く分かっていない。

本論文では、なぜ気管繊毛が高粘度環境下で粘液流を生み出す機能を果たせるのかを明らかにするため、外力に対する応答を評価した。速度に依存する抵抗力である粘性抵抗力と、ばねのような変位に依存する抵抗力を生み出すことができる光ピンセットという技術を用いて、繊毛に外力を与えたときの繊毛先端の動きを、3次元的位置情報を加えて測定した。

繊毛・鞭毛の研究の歴史は古いため、その全てを総括することはできないわけだが、『動き』が『自己調整を受けて』おり、『高度なメカニズムを内部に持っている』という点を強調することによって、研究対象の魅力が十二分に表現しようとする加藤の強い意志が感じられる。また運動する動繊毛については、周期性を生み出すメカニズムについても触れており、さらに気管繊毛にフォーカスし、本論文の目的を『外力に対してどのように応答するのだろうか』とまとめている。

第二章では、測定を行った顕微鏡の構築について記述し、分量として博士論文全体の約1/4を割いている。

3次元トラッキングと、3次元力測定を実現するための顕微鏡法に関する実験手法を解説する。溶液中の微粒子を集光したレーザー光を用いて捕捉する技術である『光ピンセット』に対し、西坂研究室で独自に開発された3次元位置検出顕微鏡を適用させた。これらの装置を用い、試料にプローブとなるポリスチレンビーズを付着させることによって、ナノメートルオーダーの空間分解能とミリ秒オーダーの時間分解能を併せ持った3次元力測定を実現した。

序文に始まり技術的背景、光路の構築、校正、機器の操作を容易にするためのソフトウェアについて説明している。加藤の研究においては、細胞小器官の運動を高精度で追跡する技術が

その根幹を為しているため、これだけの分量を博士論文に割くのは妥当である。また繊毛の運動の周期は 15-25Hz の高速で動くため、汎用のカメラのいわゆるビデオレートではその詳細な動きは撮影できない。西坂研究室のリソースを利用し、ミリ秒の 3 次元測定を実現したシステムの構築は、これからも様々な分野に応用されるポテンシャルを持っており、第二章の構成は博士論文の中でも一つのハイライトとなっている。

内容としては、光ピンセット、3次元位置検出顕微鏡、顕微鏡全体のシステム、レーザーやステージを制御するためのソフトウェアについて詳細にまとめている。これだけの装置の基本を理解し、実験中に一人で正確なオペレーションを行える加藤の能力は注目に値する。

第三章と第四章ではいよいよ結果について詳述し、原著論文の主要な図を説明しながら、またそこでは書かれていない細かい方法論や解析手法についても述べている。

まず第三章では、気管繊毛一本の動きを取得するための実験系とその測定結果について説明している。加藤は硫酸基で修飾されたポリスチレンビーズが非特異的に繊毛の先端に付着することを発見した。この技術を用いると、繊毛先端にプローブとなる蛍光性の粒子を付着させることができ、繊毛先端の動きを 3次元位置検出顕微鏡を用いて追跡することが可能となる。溶液の粘度を変えた状態で繊毛先端の動きの 3次元測定をしたところ、さまざまな条件下で繊毛の先端が有効打と回復打の高さの差を維持することを発見した。この高さの差の維持は、繊毛が非対称性を維持するという頑健性を表している。さらに加藤は、顕微鏡観察によって得られた基本データと数理モデルと組み合わせることにより、さまざまな条件下でこの高さの差を維持するという繊毛の性質が、有効な流れを生み出すことに重要であることを見出した。

次に第四章での研究は、繊毛一本に対して光ピンセットを適用したものである。そして繊毛が強い外力を加えられたときの正確なふるまいを 3次元的に解析することに成功した。繊毛の内部には、力発生ユニットである分子モーター「ダイニン」が周期的に配列されており、あるユニットの力発生が別のユニットの状態に影響されることが予想される(メカニカルなシグナルという考え方)。光ピンセットを通じて、変位に比例するような外力存在下において、ダイニンの制御はどのように攪乱されるのかを本章の問題の核心とした。二章と三章で説明した測定システムに、光ピンセットを組み合わせることによって、繊毛先端のビーズを捕捉した。光ピンセットは、ビーズをばね型ポテンシャルで捕捉する技術であるので、その抵抗力は捕捉中心からどれだけ離れたかに依存し(増張力性)、速度には依存しない。驚くべきことに、繊毛を捕捉すると繊毛先端の動きは直線状に上下運動するように変化した。このとき、繊毛軸糸の形状変化は大きく制限されてほとんど形状変化ができない状態であったのにもかかわらず、この振動は一定の周期を維持していただけでなく有効打・回復打に担当するような 2つの異なるフェーズから成り立っていた。この振る舞いは、繊毛がその形状変化をどんなに強く制限されても、有効打と回復打のフェーズを保つロバスト性をもつことを示唆する。

繊毛の正確な運動を記述することは、当該分野の研究者らの長年の夢であり、加藤の研究は(限られた条件ではあるものの)それに一步近づいたものとして高く評価されている。特に集

団の繊毛の運動ではなく、単離した僅か一本の繊毛に対してサブナノメートルの精度で実験を押し進めた加藤の執念は驚くべきものである。

第五章では本論文のまとめと展望、第六章では技術的な詳細やデータを解釈するにあたって行った仮定を「付録」としてまとめている。他、参考文献・研究業績・謝辞と続き、博士論文として十分な形が取られている。

本論文の注目すべき点は、従来は困難とされていた細胞小器官の織り成す物理現象に対して、ナノメートル・ミリ秒の時間分解能を持った精密な測定を再現性良く実現したという快挙に尽きる。取り扱いが容易ではない光学システムを基本的なレベルから理解し、自分なりの解釈を加えながらチューンアップし、最終的には確かに自分のものとした加藤の執念が行間から浮かび上がってくるのである。3名の審査員は、加藤の研究者としての潜在力について、本論文を通じて高く評価した。また第四章の内容をもって「日本生物物理学会 学生発表賞(2016年)」を受賞した業績となっている点も評価に加えた。また得られた成果は、合計8つの図から成る大作の原著論文として2018年に *Scientific Reports* 誌に発表されている。

2. 審査の方法と内容の評価

本論文は、2018年11月に提出された論文を三名の審査員がそれぞれ査読し、さらに2019年10月31日に開催した公聴会と質疑応答をもとに審査した。

論文については1に詳述したとおりである。口頭試問は非常に印象的な発表を行った。スライドは徹底的に準備されたものであり、さまざまな聴衆を含む(専門家もいれば、専門外の科学者もおり、また初学者もいる)公聴会という特殊な発表の場を十二分に意識した構成となっていた。主査は何度か加藤の口頭発表を聞いているが、間違いなくこれまでで最高の発表であった。そして審査担当者の質問に対しても淀みなく的確な回答を行った。フロアからの初歩的な質問にも丁寧に答え、研究者としての自然科学に対する誠実さを感じさせるものであった。

3. 結論

本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3名の審査員は一致して、本学位申請者に博士の学位を授与することがふさわしいと結論した。

論文審査主査 西坂崇之 教授
池上浩司 特別非常勤講師
(広島大学教授)
阿形清和 教授