

京都大学	博士 (工学)	氏名	周 航
論文題目	Measurement and Design of Flexural Rigidity of Microtubules and Their Application to Control Microtubule Collective Motions (微小管の曲げ剛性の測定とその設計技術の微小管集団運動制御への応用)		

(論文内容の要旨)

本論文は、微小管の曲げ剛性を測定および設計する方法、それを微小管の集団運動の制御に応用し、提案した曲げ剛性設計方法の有効性と実用性を理論モデルと実験により検証したものであり、6章から構成されている。

第1章は序論であり、研究の背景、目的、提案する研究方法および論文全体の構成について述べている。まず、微小管は様々な細胞機能において重要な役割を担っており、適度な曲げ剛性を持つことが生命活動に不可欠であるとともに、曲げ剛性が生体細胞内における役割に応じて動的に制御されていることを述べた。微小管の多様な機能は、モータータンパク質などの微小管結合タンパク質と協働することで実現されており、モータータンパク質による微小管運動を *in vitro* で再構築したグライディングアッセイが工学的な応用研究に用いられていると述べている。グライディングアッセイでは、曲げ剛性に依りて微小管の自由端の揺らぎが変化するため、微小管の運動方向や極性配向に影響を及ぼすことから、曲げ剛性と微小管の集団運動のメカニズムを調べるアクティブマター物理学への応用が重要であることを指摘している。

微小管の曲げ剛性は、*in vivo* においては生体機能、*in vitro* においては工学的応用において重要であるにもかかわらず、曲げ剛性に影響を与える因子については未だ十分に明らかになっておらず、報告されている曲げ剛性の測定値は文献によって大きく異なっているのが現状である。このような現状は、曲げ剛性制御機構に対する理解が深まらないだけでなく、曲げ剛性を正確に制御して工学的応用研究を進めることも困難にしている。この原因として、微小管形状の画像認識における精度が手法により異なること、および微小管重合時の条件が異なることを挙げている。これらの課題を解決するために、本論文の目的が微小管の曲げ剛性を精度良く測定する標準的な方法確立すること、および微小管重合条件の制御による曲げ剛性の設計方法を開発することであると述べている。さらに、この提案手法に基づき、曲げ剛性が微小管の集団運動に与える影響を評価することを提案している。第1章の最後に、本論文の第2章から第6章で報告している研究成果を概説し、本学位論文全体の構成について述べている。

第2章では、微小管の熱揺らぎに基づき、曲げ剛性を測定するモデルを構築している。このモデルでは、測定される微小管は、一端が固定され他端は熱揺動にさらされて自由に揺らいでいると仮定する。ここで、微小管は熱エネルギーを熱揺動の際の微小管構造のひずみエネルギーに変換しているため、それらを等しいと見なすことで微小管の曲げ剛性を揺らぎの振幅から計算した。蛍光微小管観察時の位置決定は、微小管の変位を追跡するために高精度で実施することが重要であるため、本研究では二次元ガウシアンフィッティングにより数 nm の精度で実施した。この際、微小管形状のデジタル化精度が、曲げ剛性の測定精度にどの程度影響を与えるかについて定量的に評価した。その結果、微小管の位置決定精度が低い場合には曲げ剛性の測定値に大きな誤差が生じること、さらに、特に短くて剛性が高い微小管の場合には誤差がより大きくなることを明らかにした。これにより、位置決定精度の低さが先行研究における測定値のばらつきをもたらす原因の1つであることを明らかにし、精度の高い測定が不可欠であると述べている。

第 3 章では、第 2 章で示した理論モデルに基づき、微小管の曲げ剛性を測定する実験について述べている。まず、微小管の一端をビオチン-ストレプトアビジン結合を介して金ストライプパターン上に部分的に固定し、もう一端を自由端として熱揺動により揺らぐ様子を画像解析した。微小管の変位を数 nm の位置決定精度で計測することにより、高精度に曲げ剛性を測定している。さらに、微小管の剛性に及ぼす微小管重合速度の影響を調べるため、全反射蛍光顕微鏡を用いて、重合中の微小管を実時間観察し重合速度を測定した。微小管重合時のチューブリン濃度を 20~200 $\mu$ M と変化させると、それに応じて重合速度が上昇することが明らかとなり、さらに曲げ剛性も重合速度に応じて変化することが明らかになった。チューブリン濃度 (重合速度) が低いときには曲げ剛性は一定の高い値であり、次に濃度 (速度) 依存的に曲げ剛性が低下し、高濃度 (速度) 域では曲げ剛性は一定の低い値になることが分かった。この微小管の曲げ剛性と重合速度の関係を明らかにすることで、曲げ剛性を *in vitro* で設計する方法を確立した。

第 4 章では、微小管の曲げ剛性が微小管の集団運動に与える影響について、グライディングアッセイを用いて調べた。2 種類のヌクレオチド (GTP または GMPCPP) と 2 種類の重合速度を用いて、Soft GTP-MT、Stiffer GTP-MT、GMPCPP-MT の 3 種類の剛性の異なる微小管を作製し、グライディングアッセイを行った。微小管の集団運動が等方的な状態から配向秩序のある状態へと相転移するダイナミクスを定量的に評価し、曲げ剛性が集団運動の形成に要する時間に影響を与え、最終的なネマチックパターンの形成を決定していることを明らかにした。柔らかい GTP-MT は局所的な流れを形成する傾向があり、剛性の高い GTP-MT は密な束を形成する傾向があり、GMPCPP-MT はネマティックに組織化された細い束を形成する傾向があった。さらに、曲げ剛性が微小管衝突時の運動方向変化にどのような影響を与えるかを解析するために、2 本の微小管についてその衝突時の振る舞いを統計的に評価したところ、曲げ剛性が高いほど束化した状態を安定して維持し、曲げ剛性が低いほど運動時の柔軟性が高く、局所的な流れ形状を示すことがわかった。このことから、微小管の配向の持続性と安定性が集団運動を支配していることを明らかにした。この結果は、第 3 章で述べた微小管の曲げ剛性を設計する手法の実現性と実用性をも示していると述べている。

第 5 章では、機械学習を用いた画像認識技術を導入し、3 種類の微小管をその集団運動で形成されるパターンに応じて分類する手法を提案している。集団運動の顕微鏡画像を入力、画像の微小管が属するクラスの予測を出力とする分類問題を設定し、Convolution Neural Network (CNN) を分類器として利用した。15 回の独立した実験から得られた 1500 枚の微小管画像 (Softer GTP-MT 群、Stiffer GTP-MT 群、GMPCPP-MT 群の各 500 枚) をデータセットとして、1200 画像をトレーニングデータ、300 画像を検証用データとして用いた。学習には Adam optimizer を用い、検証損失をモニターして 20 エポック学習を行った結果 97.7% のテスト精度が得られた。さらに、Score Class Activation Mapping (Score-CAM) を用いて画像中で CNN による分類への寄与が大きい領域を可視化し、機械学習による分類に寄与する集団運動の形態が、目視による観察結果と定性的に一致していることを明らかにした。

第 6 章は本論文の結論であり、本論文における研究の結果とその意義について論じるとともに、今後に向けた展望について述べている。

## (論文審査の結果の要旨)

本論文では、微小管の曲げ剛性を測定および設計する方法、それを微小管の集団運動の制御に応用し、提案した曲げ剛性設計方法の有効性と実用性を理論モデルと実験により検証したものであり、得られた主な結果は以下の通りである。

1. 位置決定精度の影響を考慮した新たな微小管剛性測定法を確立した。微小管の曲げ剛性は、特に短くて剛性の高い微小管では、位置決定精度が低いほど測定誤差が大きくなり、過小評価されることを実証した。曲げ剛性を正確に測定するためには、数 nm レベルの位置決定精度での測定が不可欠である。
2. 数 nm レベルの位置決定精度において微小管の曲げ剛性を測定し、微小管重合時のチューブリン濃度すなわち重合速度と曲げ剛性の間の関係を明らかにした。すなわち、チューブリン濃度（重合速度）が低いときには曲げ剛性は一定の高い値であり、次に濃度（速度）依存的に曲げ剛性が低下し、高濃度（速度）域では曲げ剛性は一定の低い値になることを明らかにした。これにより、チューブリン濃度を規定することで、微小管の曲げ剛性を容易に設計できることを明らかにした。
3. 曲げ剛性が微小管の集団運動に影響を与えることを明らかにした。微小管の集団運動と 2 本の微小管の衝突時の振る舞いを解析することで、曲げ剛性に依存した微小管運動の柔軟性が、その配列の持続性と安定性を規定し、さらに集団運動における相転移と最終的なパターン形成プロセスを決定していることを明らかにした。運動方向を柔軟に変える柔軟い微小管は、その配列が不安定なため局所的な流れを形成する傾向があり、運動方向を変えにくい剛性の高い微小管は、束形状を長時間維持する。これにより、微小管の配向の持続性と安定性が集団運動を支配しているという、新しい集団運動の形成メカニズムを明らかにした。
4. 機械学習を用いた画像認識モデルを開発し、微小管の曲げ剛性が集団運動に与える影響を評価した。画像認識技術を応用して微小管の集団運動形状を解析し、曲げ剛性との関係を明らかにした初めての例であり、今後の集団運動やグライディングアッセイの研究に新たな道を拓くものである。

本論文は、微小管の曲げ剛性の測定と設計手法を開発し、さらにそれを応用して微小管の集団運動を制御する体系的な理論および実験研究について述べたものであり、本提案手法が、微小管に限らず様々なフィラメント物性評価や集団運動の研究に適用できることを示しており、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、2022年1月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問をおこなって、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。