

審査の結果の要旨

氏名 蔡 碩 文

本論文は、現在プロテオーム解析のための主流の技術となっている二次元ゲル電気泳動法に代わって、迅速にタンパク質を分離するためのチップデバイスの開発に関するものであり、6章より構成されている。

第1章は緒論であり、本研究の行われた背景について述べ、本研究の目的と意義を明らかにしている。

第2章では、まずガラス基板上に一次元のキャピラリー等電点電気泳動 (capillary isoelectric focusing: cIEF) 用流路を作製し、次にプラズマ重合法によりキャピラリーの内面修飾を行い、さらにその両端に電位を印加することにより複数のタンパク質を分離し、最後にその分離能を定量的に評価している。キャピラリーチップは、ガラス基板上に幅 0.3 mm、長さ 70 mm、深さ 0.1 mm の溝をダイシングソーにより形成させている。試料溶液が接するガラスキャピラリー内壁は帯電していることから、電圧印加により電気浸透流が発生する。この電気浸透流を抑制するため、プラズマ重合法による表面改質、薄膜形成を行っている。プラズマ重合法はさまざまな物性を持つ均一な膜を形成することができ、また nm レベルの膜厚制御することが可能であると述べている。本研究では内壁修飾化のため、ヘキサメチルジシロキサン (HMDS)、アセトニトリル、2,3-エポキシ-1-プロパノールを出発物質とし、電荷および疎水性を変化させた膜を作製している。電気泳動後のバンドが容易に観察できる3種類の可視タンパク質を用いて cIEF を行った結果、HMDS をモノマーとして疎水膜を形成させたキャピラリーでは、これらのタンパク質をシャープなバンドとして分離することができたと述べている。また 2,3-エポキシ-1-プロパノールをモノマーとした親水膜を用いたときには、pH 勾配を調節することによって、より高い分離能を示したことを明らかにしている。さらに理論段数を計算したところ、従来の化学修飾であるアクリルアミド膜と同等の高い理論段数であり、毒性の高いアクリルアミドを使用しなくても再現性の高い cIEF が可能であると述べている。

第3章では、上記のプラズマ重合法で作製した膜の詳細な評価を行っている。まずフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) と X 線光電子分光法 (XPS) を用いて 2,3-エポキシ-1-プロパノールプラズマ重合膜の化学構造の同定を試みている。その結果、モノマーに含まれるエポキシ基が重合膜上にも存在することを明らかにしている。一方、酸素ラジカルによって生じたと考えられるカルボニル基なども確認され、プラズマ重合が確実に行われた可能性を示唆している。また緩衝液の pH を変化させながらプラズマ重合膜のゼータ電位を測定し、これをもとに電気浸透流の抑制を定量的に評価している。その結果、未修飾のキャピラリーに比べて、プラズマ重合膜を持つキャピラリーは電気浸透流を抑制でき、特に 2,3-エポキシ-1-プロパノール膜は未修飾の基板と比べて

約 50%も抑制できたと述べている。さらにこの膜は様々な pH の緩衝液中に 12 時間浸しても膜厚がほとんど変わらなかったことから、この膜は基板に強固に接着し、幅広い pH での使用に耐えることを明らかにしている。

第4章では、さまざまな電荷や分子量を持つ複数のタンパク質を一度に分離するために、硫酸ドデシルナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とネイティブゲル電気泳動をワンチップで行うための設計と作製、そして電気泳動による評価を行っている。ガラス基板上に分離用キャピラリーを 36 本形成し、これらのキャピラリーのうち一部をネイティブゲル電気泳動用、残りを SDS-PAGE 用としている。もう一枚のガラス基板でふたをすることによって、ネイティブゲル電気泳動用キャピラリーへの SDS の平行拡散を完全に抑制することができたと述べている。また変性ゲルまたはネイティブゲル中のアクリルアミドの濃度をキャピラリーごとに変化させることによって、さまざまな電荷や分子量を持つ複数のタンパク質を 20 分で分離することができたと述べている。さらに、ファーガソンプロットにより各試料タンパク質の電荷や分子量がタンパク質の移動度と相関関係にあることが明らかになったと述べている。

第5章では、まず一次元目に cIEF を、二次元目にキャピラリー電気泳動を連続的に行えるようなチップを設計・作製している。基板上の一次元目のキャピラリーに平行して上下に各1本ずつ未充填のキャピラリーを形成することによって物理的な空間を設けている。しかし cIEF 終了後にこの隔壁キャピラリーに緩衝液を流して二次元目のキャピラリーと接触させた直後に拡散がおこり、二次元目の電気泳動を行うまでには至らなかったと述べている。そこで、二次元目のキャピラリーに PAGE のためのポリアクリルアミドゲルを充填することによって、cIEF 中、あるいは一次元目から二次元目へのタンパク質の移動の際の拡散を抑制することを試みている。こうした設計に基づき、1 本の cIEF 用キャピラリーと 36 本の PAGE 用キャピラリーが実装された二次元キャピラリー電気泳動チップを作製している。

第6章は結論であり、本研究を要約して得られた研究成果をまとめている。

以上のように、本論文は、迅速にタンパク質を分離するためのマイクロチップデバイスの開発を目的とし、特にプラズマ重合法を利用したキャピラリーの内面修飾法の開発を行い、迅速で再現性の高い cIEF に成功している。また非変性ゲルと変性ゲルをワンチップに実装したデバイスを用いてさまざまな電荷や分子量を持つタンパク質の電気泳動も行っている。さらにこれらの技術を組み合わせた二次元タンパク質電気泳動用チップも作製している。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。