

論文の内容の要旨

論文題目 マイクロ加工技術を応用した現場型微生物遺伝子解析装置の開発

氏名 福場 辰洋

本研究は、主に半導体製作などに用いられる、「マイクロ加工技術」を応用して、小型・自動の「現場型微生物遺伝子解析装置」を開発することを目的とするものである。

近年、深海・地底などの極限的な環境に形成される微生物相に関する研究は、その独特さや多様さ、地球規模の物質循環に及ぼす影響の大きさの解明、また特殊な環境に生きる微生物の機能を工業的に利用すること等を目的として、ますます盛んになってきている。そして、それら微生物（相）に関する詳細な情報を内包した DNA や RNA を対象とした分子生物学的解析及び、標的とした微生物（相）の検出等は、今や主要な研究手法となっている。現在の所、それらの研究を実際に行うためには、主に極限的な環境からのサンプル回収→設備の整った実験室での手作業による分析といったプロセスを経なければならないのが現状である。しかし、サンプル回収から分析操作までの間に外部環境からの微生物の混入・汚染や経時的な微生物相の変化等が起こる可能性があり、それは高感度な遺伝子解析においては特に致命的な問題である。そこで本研究において、それらの問題を解決し、環境微生物学の研究・分析手法に大きなブレイクスルーをもたらすことを目的として、実際に現場で用いることのできる遺伝子解析装置の開発を目指すこととした。

実際に製作する装置は、近年深海の探査に盛んに用いられている、水中探査機や海中ロボットなどに搭載するなどして使用することを考慮すると、十分に小型・軽量で省電力のものである必要がある。そのため、本研究では装置の製作にマイクロ加工技術を応用することで、装置全体の小型・軽量・省電力化を目指した。

遺伝子解析装置を実現する為に必要な要素は、微生物を含んだサンプルの回収から増幅された遺伝子断片の解析に至るまで、図 1 に示すような一連の要素技術に分けることができる。本論文では特に、遺伝子解析において非常に重要かつ中心的な反応操作である、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を用いた遺伝子断片の増幅を現場で行うための小型・自動装置の開発について述べる。

現場で遺伝子解析を行う場合、例えば微生物相の経時的な変化をとらえる場合など、その解析は「連続的」であることが求められる。そこで、連続的な PCR を行うため Flow-through（連続流動）PCR 方式（図 2）を採用した。PCR を行うチャンバやマイクロチューブの温度を直接上下させて温度サイクルを達成する「バッチ式 PCR」と異なり、Flow-through PCR 法では PCR に必要となる 3 つの温度領域をあらかじめ定義し、それぞれの温度領域の上を PCR 溶液が繰り返

し通過することによって温度サイクルを行う方式である。この方法を用いることで、連続的な PCR が可能となるだけでなく、バッチ式のように高速な温度制御が必要ないため、ヒータの制御が簡便化できる。また、送液も一定の流速を保つだけで PCR が可能であるため、非常に単純なもので十分である。現場で用いる機器は自動制御可能であることが求められるため、この様に制御を簡便化できることは非常に有用である。

本論文では、主にウエットエッチングによって製作したヒータ及び温度センサを有するガラス製温度コントロール基板と、モールドイング(型どり)法によって製作したシリコーンゴム(ポリジメチルシロキサン:PDMS)製微細流路チップに小型のポンプ・バルブからなる送液系及び制御装置等を組み合わせることによって「現場型 Flow-through PCR 装置」を製作した(図3)。Flow-through PCR を行う部分の材質として光学的に透明であるガラスと PDMS を用いることによって、増幅された遺伝子断片の光学的検出などにも適用可能である。

PDMS はその光学特性及びモールドイング法による精密な型どりが可能である、という点で微細流路の製作に非常に適しているが、その疎水的な表面は、未処理の場合タンパク質を不可逆的に吸着してしまうという問題があり、そのままでは酵素(DNAポリメラーゼ)を用いた反応である PCR を行うことができない。そこで本論文において、生体適合性ポリマーである MPC ポリマーを用いた PDMS の表面改質手法を新たに開発した。これにより、PDMS 表面へのタンパク質吸着が有意に抑制されることを確認した。

本論文において製作した装置を用いて実際に PCR を行うことで、その性能について評価を行った。その結果、モデルとして用いた大腸菌のゲノム DNA から、標的とした遺伝子断片(16S rRNA 遺伝子)を高効率かつ高速に増幅することできた。また、あらかじめ DNA 抽出を行わず、大腸菌の菌体から直接 PCR による遺伝子断片を行う方法(ダイレクト PCR)も、製作した Flow-through PCR 装置を用いて行うことが可能であった。ダイレクト PCR 法を応用して、実際に増殖中の大腸菌培養液をサンプルとして用いた連続的な PCR を行ったところ、大腸菌の増殖の様子を連続的にとらえることに成功した。また、その実験には約 13 時間を要したことから、長時間にわたって安定した PCR を行うことが可能であることも示された。

さらに、本論文において、深海等に代表される様な高水圧環境下における PCR の可能性についても検討し、DNA 変成温度等の反応条件を調節することで高圧条件下 PCR は可能であることを述べた。そこで、高圧かつ低温の深海環境を模擬するシステム、「高圧実験水槽システム」を構築し、それと Flow-through PCR 装置を用いて高圧条件下 PCR を行った。10MPa、30MPa(それぞれ水深約 1000m 及び 3000m に相当)条件下で装置を稼働させ、PCR を行った結果、それぞれの条件下において標的とした遺伝子断片の増幅を確認できた。また、高圧力による PCR への阻害効果などはほとんど見られなかった(図4)。

以上の様に、本論文で製作した現場型 Flow-through PCR 装置を用いることで、連続的な PCR

による活動的な微生物相の経時的な変化をとらえることが可能であることが実証され、また、その装置は深海などの高圧環境下で使用することも可能であった。この現場型 Flow-through PCR 装置にさらに細菌などの菌体から DNA を抽出する機能や、増幅した遺伝子断片の解析機能を集積化することで、最終的な目的である「現場型遺伝子解析装置」を実現することができる。また、本論文で取り扱った PCR は、溶液の混合、正確な温度制御、送液等、他の生化学反応に必要なほとんどの要素技術を含んでおり、この現場型 Flow-through PCR 装置の開発によって得られた知見は、今後様々な現場で用いるための生化学分析装置を開発するにあたって、非常に有用なものであると確信する。

本論文の構成を以下にまとめる。本論文は全 9 章から成る。

第 1 章では本研究の目的と概要、及びその背景、特に環境微生物を対象とした遺伝子解析の重要性と研究の現状について概説し、現場型遺伝子解析装置の重要性について論じた。

第 2 章では遺伝子解析において重要な要素である PCR について説明し、 μ TAS 等の研究分野において、主にマイクロ加工技術によって製作された装置について、主に PCR を目的としたものを例示しながら概観する。また、連続的な PCR を行うための方法として Flow-through（連続流動）PCR 法を挙げ、そのためのマイクロデバイスについてもその特徴と開発の現状などについて述べた。

第 3 章では、現場型遺伝子解析装置の設計要件について、主に海洋環境で用いることを想定して論ずる。また、実際に活用されている海中探査機への搭載を仮想し、さらに詳細な設計要件と、それを満たすために必要な要素技術についての課題抽出を行う。

第 4 章では高圧環境下における PCR の可能性を議論するため、PCR に不可欠な酵素である DNA ポリメラーゼ及び DNA に対する圧力の影響について考察し、高圧条件下で起こり得る問題とその解決法等について論じた。

第 5 章では主に第 3 章で論じる設計要件に基づいて、マイクロ加工技術を応用した現場型 Flow-through PCR 装置の製作のための具体的な設計を、主に温度コントロール基盤、微細流路チップ、ポンプ・バルブ等の送液系に分けて述べた。

第 6 章では、第 5 章で設計を行った Flow-through PCR 装置の製作、主に薄膜材料（ITO 及び白金）のウエットエッチングによるパターニングとシリコンウエハ上に形成された反転型（モールドマスタ）を用いた PDMS のモールドイング（型取り）による微細流路チップの製作と、MPC ポリマーを用いた表面処理プロセスについて述べる。また、送液系の選択及び装置制御に必要なアンプ基盤等の製作についても述べた。

第 7 章では本論文で製作した現場型 Flow-through PCR 装置を用いて、基礎的な評価実験及び連続的解析に関する評価を行い、その結果について論じた。また、高圧実験を行うためのシステム（高圧実験水槽システム）の構築についても述べ、それを用いた高圧条件下での PCR につい

てその結果と考察を論じた。

第8章では本論文中において製作し、評価を行った Flow-through PCR 装置について、現場型遺伝子解析装置の一部としての要件を満たしているかについて、主に第3章で挙げた要件と対比しながら考察を行った。

最後に、第9章において本論文の内容をまとめ、現場型遺伝子解析装置実現の為の今後の展開等について述べた。

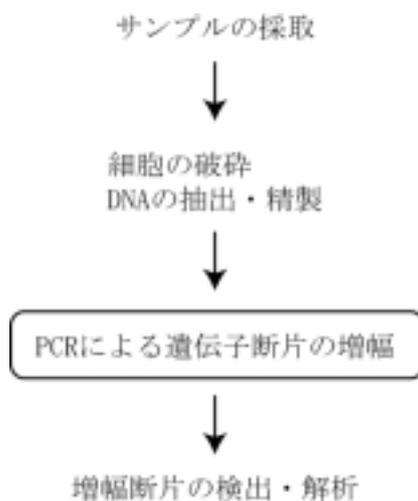


図1 遺伝子解析の要素技術

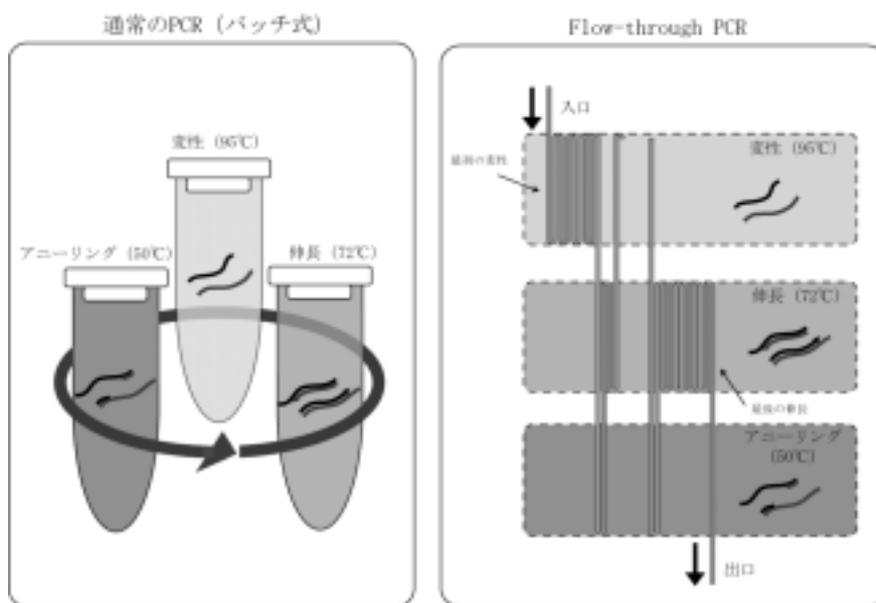


図2 Flow-through PCR の概念図



図3 Flow-through PCR 装置

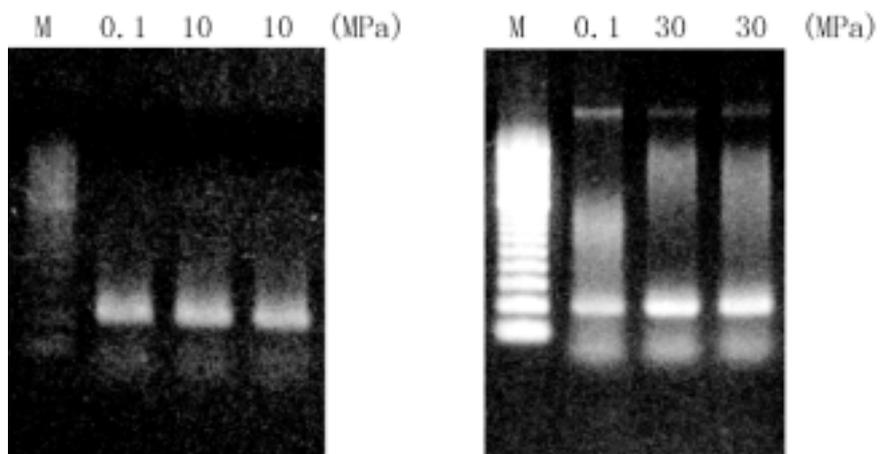


図4 高圧条件下における PCR の結果
(左 10MPa , 右 30MPa)