

論文の内容の要旨

論文題目 **細胞機能の環境応用に向けた細胞多段階処理デバイスの開発**

氏 名 茂木 克雄

本研究では、植物や微細藻類等の細胞の持つ有用機能の環境分野への応用を支える研究基盤に組み込むことのできる、多段階の試薬処理を行うためのマイクロ流体デバイスの開発を行った。

現在、緑地の砂漠化やエネルギー不足等の環境問題の深刻化に伴い各分野から様々な対策がなされてきている。その中でも生物の細胞の特異的な機能を利用することに期待が注がれている。これは、特定の植物の持つ乾燥耐性、低温耐性、塩耐性等の様々な有用機能の組み合わせを行ったり、別の種に組み込ませることで、環境順応性を高める事を狙ったものであり、果として地球規模で起こる環境変動により発生する緑地減少や砂漠化、それに伴うCO2増加や食糧危機に対する打開策となりうる。また、現在バイオエネルギーの生産資源としてオイル生産を行う微細藻類が注目を集めており、オイル生産を行う細胞内の機能の解明とその利用に関する研究が盛んに行われている。

しかし、環境分野への機能応用が期待される植物や微細藻類等の細胞は、細胞壁を有するため細胞内へのアプローチが困難であり、機能を利用する上で必要となる細胞機能解明のための基礎研究のハードルが非常に高くなっている。細胞内へのアプローチが困難であるということは細胞機能の各種評価を行うための試薬処理における効率が低くなることを意味する。また、環境応用へつながる様な生物は現在も世界中で探索されており、特異環境でサンプリングするほとんどの種は培養方法が確立されていない。そのため、従来の試験管ベースで行われる試薬評価に必要な大量の細胞サンプルを準備するための負荷が大きくなってしまふ。また、細胞に対する多段階の試薬処理は従来の煩雑な処理行程におけるヒューマンエラーも考慮しなければならないため、高効率で試薬反応を行えたとともに煩雑な処理工程の改良が望まれている。

一方で工学の研究は産業貢献のための技術のみならず様々な分野の課題を解決する工学的技術を生みだし続けており、特に生化学分野に浸透してきているマイクロ流体デバイスを用いたマイクロ流体操作の技術は90年代初頭から急速に発展してきている。マイクロ流体デバイスの主な特徴は、数マイクロから数百マイクロメートル径の微細な流路に試薬を流し込むことで、マイクロ流体の特性を活かし試薬反応の高効率化、有毒試薬の危険性低減、外気からの隔離による低コンタミネーション等を狙ったものである。

本研究では、このマイクロ流体デバイスの技術を利用して、環境応用が期待され

る植物や微細藻類の様な細胞壁を有する細胞への試薬反応を高効率化し、煩雑な処理工程の一元化を狙った。本研究で新たに考案した副尺構造を用いた機構を組み込んだマイクロ流体デバイス：細胞多段階処理デバイスは、従来の多段階で行われる細胞への試薬処理をマイクロ流路内で効率的に行うことを可能にした。細胞多段階処理デバイスに送液された懸濁液中の細胞は少量がサンプリングされ、流路内の副尺構造によりサイズごとに分けて固定される。流路内の副尺構造による細胞固定領域にはバイパスエリアが並行して設置されており、大部分の懸濁液がバイパスエリアを流れて流路の出口に向かうため、本デバイスは従来の細胞固定機構を持つマイクロ流体デバイスと異なり目詰まりを起こすことがない。また、本細胞多段階処理デバイスは懸濁液と溶液の送液コントロールのみで細胞の固定から試薬反応、取り出しまでを行うことができる有用性の高い設計機構となっている。

本研究では、考案したデバイスの流路機構を実現させるために、細胞固定用の副尺構造の形状を変化させない硬質材料としSCR 1016とStycast 1266を新たに取上げてマイクロ流体デバイスとしての特性の評価を行った。取り上げた2つの材料に対し、流路内観察が行えるかを判断するための光学的観点と扱う生物に対する毒性の観点から評価を行い、マイクロ流体デバイスの材料として広く利用されてきたSilpot 184と比較することで、利用可能性を確認した。

製作した細胞多段階処理デバイスはSilpot 184とSCR 1016または、Stycast 1266とを組み合わせた多層構造のデバイスとなっており、デバイスの細胞固定機構と細胞取り出し機構に関して人工粒子の固定と取り出しを行うことで機能評価を行った。結果として、数マイクロから数十マイクロメートルの粒子を分離してそれぞれ所望の副尺構造で固定することに成功した。またそれぞれのサイズごとに固定された粒子を取り出すことにも成功した。

続いて行った細胞を用いた評価では、植物や微細藻類と同様に細胞壁を有する酵母を用いた。酵母細胞に対する遺伝子導入処理を多段階試薬処理のモデルケースとしてデバイスに実装し、従来の操作との違いを比較検討した。その結果として従来の試験管ベースでの実験操作で求められていた煩雑な処理行程の削減、処理の一元化と、高い効率性とそれに伴う使用サンプル、評価試薬の少量化を可能とした。

煩雑な処理行程の削減については、考案した本デバイスの副尺機構により、懸濁液中の不要物や細胞をサイズごとに分離してそれぞれ固定できるためフィルタリング等の前処理行程を必要とせずに培養液を直接デバイスに送液することが可能となった。また、細胞を固定する機構を持つマイクロ流体デバイスでは従来、流路の目詰まりに注意しなければならなかった。本デバイスには大量の細胞を扱う場合でも流路目詰まりを起こさないようにするために、流路内にサンプリングしない過剰粒子を出口ポートへ送るためのバイパスエリアを設けている。そのため、流路目詰まりを回避するための懸濁液中細胞の濃度調整行程も必要としない。処理の一元化については、従来行われてきた細胞に対する多段階の試薬処理において必要となる遠心処理などの段階的な操作行程が、本デバイスでは懸濁液や試薬溶液の送液切り替えのみで行ってしまう。これにより、従来の煩雑な処理工程で必要とされた所要時間や必要機材が不要となり、ヒューマンエラーへの注意が軽減される。特に所要時間に関しては、従来の遺伝子導入処理実験が3時間15分程かかったのに対し、約10分の1の20分で完了している。

高い効率性とそれに伴う使用サンプル、評価試薬の少量化については、酵母と酢酸リチウムの反応実験において従来の反応所要時間が1時間であった処理に対し、本デバイスを用いることにより数分で処理が完了することが示された。これは、流路

内に固定した細胞に対し常に新しい試薬を送液することで、細胞の表面に接する試薬の濃度を常に一定に保つことが出来るためである。また、細胞と試薬の反応傾向を蛍光等により経時的に観察し続けることができることも本デバイスの特徴であり、これにより試薬反応の進行を連続的に把握し試薬反応が完了する時間を正確に確認することができる。酵母の遺伝子導入実験の結果、本デバイスを用いたときの遺伝子導入の成功率は使用した細胞数に対する遺伝子導入成功株数で表した場合、従来の方法の580倍となり、必要となる細胞サンプルと反応試薬の少量化に成功した。

以上の成果は、製作した細胞多段階処理デバイスに酵母への遺伝子導入処理を実装して得られたものであるが、環境応用に向けた植物細胞や微細藻類も酵母と同様の多糖類ベースの細胞壁を有する共通点から副尺構造によるフィジカルな固定方法が有効であると考えられる。また、細胞サイズについてはそれぞれの種によって異なるが、オイル生産を行うことで注目を集めているボトリオコッカス等の微細藻類は酵母とほぼ同サイズであるため、適用時に酵母と同様の扱いが可能であると推測できる。製作した細胞多段階処理デバイスは今後、環境応用に向けた植物や微細藻類に対する遺伝子操作や流路内培養、試薬耐性評価とその観察などの多岐にわたる応用が期待される。