

## 審査の結果の要旨

氏名 茂木 克雄

本論文は、細胞機能の環境関連分野への応用を想定して、植物や微細藻類などの機能解明ならびに機能改変を行うための多段階処理を行うマイクロ流体デバイスを実現しようとするものである。環境中での機能応用が期待される植物や微細藻類等については、培養が難しく大量のサンプルを準備することができない種の存在や、特に細胞壁の存在によって、遺伝子導入処理が煩雑で効率が低いことが知られており、これらのことが遺伝子工学的なアプローチによって機能解明ならびに機能改変を行う際のボトルネックとなっている。これに対し、本論文では、マイクロ流体デバイスを用いる実験系を用いれば、遺伝子導入に必要な一連の処理について、工程数の削減、処理効率の向上、人為的ミスの低減等が見込めることに着目し、細胞に対する多段階処理を行うマイクロ流体デバイスを新たに提案するとともに、酵母を対象として、その具体的な性能の評価を行っている。

具体的なデバイスの機能としては、前処理を必要とせず狙ったサイズの細胞のみをデバイス内部に捕捉し、捕捉した細胞に対して試薬処理を行い、処理後の細胞を取り出すことが想定され、独自に考案した「副尺構造」を用いることによって、細胞懸濁液中からサイズに応じて細胞を捕捉できる。副尺構造を実現するためには、デバイス製作時に上下2つのパーツを精密にアライメントする必要が生じるが、そのために新たに提案するアライメント法と合わせて、従来のマイクロ流体デバイスとは異なる全く新しいデバイス構造を実現するに至っている。

デバイス機能の検証を行うために、蛍光粒子を用いたサイズ毎の粒子捕捉ならびに取り出し機能の評価を行うとともに、細胞壁を有するモデル細胞として酵母を用いた遺伝子導入実験を行い、従来の実験方法と比較して10分の1の時間で一連の処理が実行可能であり、また遺伝子導入効率も数百倍改善されることを示している。これにより、本デバイスを用いれば、培養が困難な希少種や成長速度の遅い種など、大量のサンプルを用意することが難しい対象であっても遺伝子導入操作を行いうることが示唆される。

本論文の第 1 章では、研究の背景と目的、ならびに論文の構成について述べており、細胞機能の環境応用に関する事例を概観したのちに、当該分野をターゲットとしてマイクロ流体デバイス技術を応用する意義を述べている。

第 2 章では、提案するマイクロ流体デバイスの概念ならびに構造について、要求される機能を整理した後に、具体的なデバイスのデザインを示している。副尺構造による細胞固定機構の構造とその動作原理を提案するとともに、固定された細胞を取り出す機構と、そのための流体操作方法について述べている。

第 3 章では、デバイス材料について、特に酵母に対する毒性に着目した検討を行った上で、製作方法と手順について述べている。製作にあたっては、アライメント構造を導入することによって、1 ミクロン以下の精度で流路のアライメントが行えることを示している。これによって、細胞捕捉をサイズ毎に行うための副尺構造を正確に製作することが可能となる。

第 4 章では、蛍光微粒子を用いて実際にデバイス内部で流体操作を行い、直径 5 ミクロンの解像度で粒子をサイズ毎に捕捉できることを示すとともに、必要なサイズの粒子のみを取り出す操作が可能であることを確認している。

第 5 章では、細胞壁を有する代表的な細胞として酵母を取り上げ、実際にデバイス内部に捕捉した酵母について、トリプトファンをセレクションマーカーとし、蛍光タンパク質の遺伝子が挿入されたプラスミドを酢酸リチウム法によって導入する処理を試みている。試薬による処理時間等について最適化を行った後の条件であれば、30 $\mu$ L (マイクロリットル) の培養液について、7 株ほどの遺伝子導入が可能であり、なおかつ全体の処理時間は 20 分足らずで十分であることを示している。

第 6 章においては、本論文で提案したマイクロ流体デバイスについて、試薬反応の効率や操作性、汎用性等について考察した後、第 7 章において結論と今後の展開について述べている。

以上のように、本論文は、酵母に代表されるような細胞壁を有する細胞への遺伝子導入に必要な多段階処理を一元的に行うことができるマイクロ流体デバイスを提案し、実際に遺伝子導入を行う実験を通して、その有用性を実証したものである。本論文で創出された新しい概念のデバイスは、酵母だけでなく、植物細胞や微細藻類など広い範囲の細胞を対象として、高効率に遺伝子導入処理を行う上で、大変有用なデバイスであり、これらの対象に関する生物学的な理解に貢献するのみならず、近い将来、特に二酸化炭素固定や有用物質生産、沙漠化防止等の環境関連分野における細胞機能応用を進める際の技術的基盤を与えるものであり、工学に資するところがきわめて大きい。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。