

審査の結果の要旨

氏名 金 秀炫

本論文は、**pL** (ピコリットル) や **fL** (フェムトリットル) といった極めて微小な体積で生物学的な分析を行うことができるマイクロチャンバアレイについて、その用途を広げると同時に新しい概念に基づく分析法を実現するための技術を構築しようとするものである。微小体積を扱う方法には、マイクロチャンバに加えて、脂質二重膜や液滴を使う方法など、いくつかの手法が提案されているが、本論文では、デッドボリュームが小さいこと、微小体積が正確に定義できること、機能を付加できること等の優位性に着目してマイクロチャンバをとりあげ、その新たな機能や用途について検討している。

マイクロチャンバの概念については従来から提案されてきたものであり、たとえば **fL** (フェムトリットル) オーダーのチャンバについては、これまでに酵素の機能解析を一分子単位で行うことを目的とした研究がなされている。これに対し、本研究では、チャンバ内で直接タンパク質を合成することによって、極めて高密度かつ純度の高いタンパク質アレイを製作するための技術基盤の構築を試みている。また、ある細胞集団について、個々の細胞それぞれについて同時並行的に生物学的解析を行う新しい概念の解析方法を提案し、マイクロチャンバアレイを用いて、これを実現する方法を示すに至っている。

従来の生物学的な実験手法においては、一般に、ある体積に含まれる分子や細胞を集団として取り扱い、その平均値を計測することが行われてきた。これに対して近年では実験技術の進展に伴い、一分子や一細胞単位で解析を行うことが可能になってきている。その一方で、特定の集団に含まれる分子や細胞には、個々にばらつきがあることが指摘されているにもかかわらず、一分子あるいは一細胞解析を多数同時並行して行う方法は確立していない。本論文は、このような問題に対し、一細胞ずつ個別的に、かつ多数の細胞を同時に解析する新しい概念の解析方法を提案するものである。

具体的には、マイクロチャンバアレイの各チャンバ内部において生体外タンパク質合成反応を行う方法について検討を加え、特にリン脂質ポリマーの一種である **MPC** ポリマーによるコーティングを行うことによって、確率的に **DNA** 一分子から **EmGFP** や **YFP** などの蛍光タンパク質を合成することに成功している。これにより、合成されるタンパク質の純度の高さが保証されるとともに、チャンバ間距離が数マイクロメートルほどの高密度アレイの実現が期待できる。

一方、マイクロチャンバアレイに電極構造を組み込むことによって、捕捉した細胞内に含まれる物質の解析を多数同時並行的に行うことができるデバイスを新たに提案している。電極構造を付加することによって、誘電泳動を用いて細胞を能動的に捕捉した上でチャンバを密閉し、電氣的に細胞を破砕する機能が実現できる。このデバイスを用いて、個別細胞の内部に含まれる ATP の濃度を計測し、同一の細胞集団であっても一定の分布があることを見出している。

本論文の第 1 章では、研究の目的と背景、ならびに論文の構成について述べており、微小体積の液体を対象とする実験手法を概観したのちに、マイクロチャンバアレイに関わる新しいコンセプトの提示を行っている。

第 2 章では、マイクロチャンバアレイの機能や特徴を概説するとともに、電氣的機能を付加する意義について述べている。

第 3 章では、すでに提案されているマイクロチャンバアレイの内部で生体外タンパク質合成反応を試み、DNA 一分子から蛍光タンパク質が合成可能であることを示し、理論上 2500 倍以上高密度なタンパク質アレイが実現可能であると考察している。

第 4 章では、電極集積型マイクロチャンバアレイを提案し、デバイスの全体構造や、チャンバ及び電極のサイズ等、設計パラメータに関する検討結果について述べた後に、実際に細胞を捕捉し、破砕する機能の検証を行っている。

第 5 章では、新しい解析法のコンセプトに基づき、細胞内の ATP 濃度計測を一細胞単位で、かつ多数同時並行的に行うことを試みている。特定の細胞集団における細胞毎の ATP 濃度の分布が計測可能であること、また ATP 合成を阻害する物質で処理することにより、濃度の平均値のみならず、分布の変化も捉えられることを実証している。

第 6 章においては、本論文で提案したマイクロチャンバアレイの新たな用途ならびに新しい概念の計測手法の位置づけについて考察を加えた後、第 7 章において結論と今後の見通しについて述べている。

以上のように、本論文は、マイクロチャンバアレイの応用を、一分子や一細胞のみに焦点を絞る用途だけでなく、それらを多数アレイ化して分析する新しい分析法の概念を提案し、その具体的な実現方法を提示したものである。本論文で創出された技術は、新しい実験手法として広く基礎的な生命科学分野における貢献が期待されるだけでなく、近い将来の一分子あるいは一細胞レベルでの網羅的診断及び解析手法を実現する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。