

氏名(本籍)	佐伯大輔(茨城県)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第5747号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Development of Microcompartmentalized Biochemical Reaction System Using Semi-permeable Microcapsules (半透性マイクロカプセルによりマイクロコンパートメント化した生化学反応システムの開発)
主査	筑波大学准教授 博士(工学) 市川 創作
副査	筑波大学教授 農学博士 佐藤 誠吾
副査	筑波大学教授 農学博士 足立 泰久
副査	筑波大学准教授 博士(農学) 青柳 秀紀

論文の内容の要旨

生体分子や細胞の分析、スクリーニングに生化学反応を取り扱う分野では、分析対象が微小で数多く存在するため、ハイスループット化が求められている。従来、試験管からマイクロプレート、マイクロチップといった、二次元的なアレイ化により反応器のスケールダウンとナンバリングアップが検討されてきた。しかし、これらのアレイ型反応器では、微細化や反応の検出と分析、反応場のマニピュレーションの複雑化などの問題があり、ナンバリングアップに限界がある。一方、近年エマルションのような微細分散系を、分散型反応器として利用する検討が行われている。分散状態の反応器に物質を供給し、反応を行うことができれば、反応器の超並列的な操作が可能な反応システムを構築できると考えられる。しかし、既往の研究では、微細分散系の反応器としての安定性や、反応器内部への逐次的な物質供給の課題がある。本論文は、より実用的な分散型反応場の構築を指向し、選択的物質透過性を有する半透性マイクロカプセルを微細分散型の反応器として用い、生化学反応系をマイクロコンパートメント化した反応システムの開発を行った。

マイクロカプセルを反応器として用いるためには、反応器の均一化のため、カプセル粒径の制御や内包化量の制御が重要である。本論文では、均一な液滴を作製できるマイクロfluidicの技術を利用して、water-in-oil-in-water (W/O/W) エマルションを作製し、これを基材として粒径の均一なマイクロカプセルを作製する方法を検討した。まず、極めて薄い油相を有する超薄膜 W/O/W エマルションを調製するため、マイクロ流路を開発した。その結果、段差構造、および疎水性流路表面を有するマイクロ流路を用いて、内水相が単一で、油相の厚さが極めて薄い超薄膜 W/O/W エマルションを調製できた。また、開発したマイクロ流路を使用し、W/O/W 液滴の内水相に、水溶性分子や固体微粒子を均一かつ効率的に分注し、内包化することもできた。

次に、超薄膜 W/O/W エマルションを基材として、粒径の均一な半透性マイクロカプセルの作製技術を開発した。ポリアニオンであるアルギン酸を内包化した超薄膜 W/O/W エマルションの外水相に塩化カルシウム溶液を添加し、浸透圧差を利用してエマルションの超薄膜油相を崩壊させることで、内外の水相に存在す

る分子の反応を誘発し、粒径の均一なアルギン酸カルシウムのマイクロビーズを得ることができた。また、この作製技術により、ポリカチオンであるポリエチレンジアミンとアルギン酸との静電的相互作用を利用して、ポリイオンコンプレックス膜で覆われたマイクロカプセルを作製することもできた。得られたマイクロカプセルは、カプセル外からカプセル内に低分子物質を透過する一方で、固体微粒子や分子量が1万以上の高分子物質はカプセル内に保持し、分子量に応じた選択的物質透過性を有する半透性マイクロカプセルを作製できた。

上記の半透性マイクロカプセル作製技術と、マイクロ流体デバイスによるカプセル内への物質分注技術、また、半透膜による物質供給技術を統合し、マイクロコンパートメント化した生化学反応システム構築の検証実験を行った。すなわち、半透性マイクロカプセルを微細分散型反応器とし、モデル反応系として無細胞タンパク質合成反応を超並列的に行った。DNA および無細胞タンパク質合成に関与する酵素を半透性マイクロカプセル内へ分注、内包化した後、核酸やアミノ酸などの基質分子を半透膜の物質透過を利用して外部水相から供給した。その結果、カプセル内で活性を有するタンパク質を合成できた。

以上、本論文の検討により微細分散型の超並列反応器として、安定性に優れ、物質の保持と供給が可能な半透性マイクロカプセルを作製し、これを利用してマイクロコンパートメント化した生化学反応システムを開発することができた。

審査の結果の要旨

本論文は、生化学反応系を半透性マイクロカプセルにマイクロコンパートメント化し、分散型の超並列反応システムの開発を試みたものである。微細分散系であるカプセルを反応器として超並列的に利用するため、反応器の均一化、物質の分注、ならびに、物質の保持と供給に着目し、カプセルの設計および作製方法を検討した。その結果、独自のマイクロ流路を設計して超薄膜 W/O/W エマルションを調製し、これを基材として、分散型の超並列反応器として適した特性の半透性マイクロカプセルの作製に成功した。また、作製したマイクロカプセルを使用して、無細胞タンパク質合成反応を行い、生化学反応の反応場として利用できることを実証した。分散状態の半透性マイクロカプセルをマイクロコンパートメント化された超並列型の反応器として設計・作製し、無細胞タンパク質合成に利用するシステムを開発した先進的な成果といえる。本論文ではモデル系での実証にとどまり、開発した技術の汎用性に関する検証は残されているが、マイクロカプセルのような分散状態の微小空間において生化学反応を行い、その利用の可能性を示したことは、生物反応工学的手法を微小反応場の設計と制御へと拡張する有用な成果であり、高く評価できる。また、反応器の超並列的な操作が可能な分散型生化学反応システムの実現に向けた有用な知見を明らかにしており、ハイスループットな生化学分析や、スクリーニング技術の発展につながるものと期待される。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。