

微生物を用いるオンチップバイオアッセイの開発と 変異原性試験への応用

学位論文内容の要旨

現代社会が直面する環境やエネルギーに関する諸問題を考えると、それらを解決するための低環境負荷、省資源型を指向した科学技術の開発は重要な研究課題である。分析化学においては、これらの課題に対応するための新たな分析システムとして、半導体微細加工技術を利用してシリコンなどの小型基板(チップ)上に形成した微小空間内で物質分離や化学分析を行うマイクロ分析システム(μ -TAS)が提案された。 μ -TASは分析プロセスのシステム化により操作の簡便化や分析時間の短縮化などを可能にすることから、タンパク質や遺伝子をターゲットとする生化学分野への応用を中心に盛んに研究が行われている。一方、生物学的な分析方法である細胞を用いるバイオアッセイは、生体に対する化学物質の毒性などの影響を直接的に評価できることから環境分析や医薬品のスクリーニングなどに利用されている。しかしながら、煩雑な操作や長い分析時間を必要とするため、これらを軽減しうる μ -TASを利用したオンチップバイオアッセイの開発が期待されている。オンチップバイオアッセイでは、細胞の機能を発現できる微小空間の構築とともに、少量の試料で多検体・多項目のアッセイを同時に実行できる高性能なアッセイフォーマットが求められるが、現状では微小空間での細胞の集積化および機能発現などの基礎的な研究にとどまっており、実用化に向けたアッセイフォーマットの開発に関する研究は行われていない。

このような観点から本論文では、実用可能なオンチップバイオアッセイフォーマットの開発とその応用を目的とした。そのため、多検体・多項目の一斉分析が可能な新しいオンチップアッセイフォーマットとして、複数のチップで構成される微小流体ネットワークを用いる方法を開発し、生物学的分析システムとしての基礎的な性能を明らかにした。さらに、微生物を用いる変異原性試験に応用することで、その有用性を明らかにした。

本論文はそれらの経緯をまとめたもので、全7章から構成されている。以下に各章の概要を示す。

第1章は序論であり、本論文の背景と目的について述べている。

第2章では、細胞を固定化する貫通孔(ウェル)をアレイ状に配置したチップと試料を導入するチャンネルを平行に配置したチップを組み合わせ、そこに形成される3次元微小流体ネットワークを利用した新規オンチップバイオアッセイフォーマットを考案した。このフォーマットでは、2枚のポリジメチルシロキサン製マイクロチャンネルチップとそれに挟まれた1枚のシリコン製貫通ウェルチップを使用する。アガロースに懸濁したアッセイ用試験菌株を一方のチャンネルチップから導入し、ウェル内でゲル化する。次いで、別のチャンネルチップか

ら測定物質を導入して試験菌株と反応させることで、アガロースゲルで固定化した複数のアッセイ用試験菌株と複数の被験物質を掛け合わせた全ての組合せのアッセイを一組のチップ上で行うことが可能である。ここでは、25(5×5)個の貫通ウェルを有する試験菌株固定化用チップならびに5本のチャンネルを有する試験菌株および試料導入用チップをそれぞれ作製した。発現誘導物質としてマイトマイシンC (MMC) によりルシフェラーゼを発現する複数の大腸菌をモデル菌株として用い、考案したフォーマットにおいて発現ルシフェラーゼによる生物発光(BL)の測定を行った。その結果、モデル大腸菌の種類およびMMCの濃度の組合せに応じた強度の異なる25通りのBLを一組のチップ上で一斉に検出することができた。これにより、本フォーマットによるオンチップバイオアッセイが可能であることを明らかにした。

第3章では、本オンチップアッセイの分析システムとしての特徴を明らかにするために、アッセイプロセスの速度論的モデルを提案し、BL反応を用いてその解析を行った。オンチップアッセイでは、チップ内に供給された被験物質や酵素基質が、微生物を保持するゲルと細胞膜を透過し、細胞内で反応するプロセスとなっている。BL応答曲線から各プロセスの速度定数を求めたところ、物質の膜透過プロセスが発光応答時間や分析感度に影響を与える主要因であることを明らかにした。

第4章では、本フォーマットにおける固定化菌体の生育および遺伝子機能について検討した。 3×10^8 cells ml^{-1} の大腸菌を用いて液体培地中で静置培養した場合、菌体濃度は約5時間で2倍となったのに対し、固定化した場合は、約2.5時間で2倍となった。一方、 1×10^{10} cells ml^{-1} の大腸菌を用いた場合、液体培地中では菌体濃度に変化が見られなかったのに対し、固定化した場合は菌体濃度が減少し、約2.5時間で1/2となった。また、チップ内に保持された菌体は、培養液中に存在する場合と同様の遺伝子発現機能を示した。したがって、固定化された菌体は正常な遺伝子発現機能を有するものの、培養液中とは異なる生育特性を示し、また、その増殖および死滅が菌体濃度に依存することを明らかにした。

第5章では、本オンチップフォーマットをSOS応答に基づくルシフェラーゼの遺伝子発現を指標とした変異原性試験に応用した。変異原物質としてMMCを用い、培養液を用いる従来法と比較した。その結果、本フォーマットにおいても変異原性の強さを示す用量反応曲線が従来法と同様に得られ、検出下限はいずれの方法においても0.2 ng ml^{-1} となった。その他代表的な変異原物質数種類についても同様の結果が得られた。また、分析時間に関しては、約8時間を要していた従来法のアッセイを約2時間に短縮することができた。これらのことから、本フォーマットがSOS応答に基づく変異原性試験に有用であることを明らかにした。

第6章では、高濃度の菌体を微小空間内に固定化した場合にその死滅が促進されることに着目し、致死感受性を指標としたオンチップフォーマットの変異原性試験を新たに考案した。致死感受性に基づく従来の試験法では、感受性の異なる2種類の試験菌株を用い、コロニー計測に基づく菌体の生存率の違いから変異原性を評価する。しかしながら、チップ上でコロニー計測を行うのは困難であるため、発現ルシフェラーゼによる発光量を生存率の指標とする方法を新たに考案し、本フォーマットに適用した。MMCを用いて検討したところ、二つの試験菌株の生存率の違いをBL強度に基づいて算出することが可能となり、MMCの変異原性を検出することができた。分析時間は約3時間であり、数日を要していた従来法から大幅に短縮することができた。これらのことから、本フォーマットを用いてBL強度を生存率の指標とすることで、致死感受性に基づく変異原性試験が可能であることを明らかにした。

第7章では、以上の結果を総括した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	上 館 民 夫
副査	教授	棟 方 正 信
副査	教授	高 木 陸
副査	教授	田 口 精 一
副査	助教授	谷 博 文

学 位 論 文 題 名

微生物を用いるオンチップバイオアッセイの開発と 変異原性試験への応用

現代社会において、低環境負荷・省資源型を指向した科学技術の開発はますます重要になっている。これらの課題に対応するための新たな分析システムとして、半導体微細加工技術を利用してシリコンなどの小型基板（チップ）上に形成した微小空間内で分析操作を行うマイクロ分析システム(μ -TAS)が提案された。 μ -TAS は分析プロセスのシステム化により操作の簡便化や分析時間の短縮化などを可能にすることから、タンパク質などを対象とする生化学分析での応用が盛んに試みられている。一方、生物学的な分析方法である細胞を用いるバイオアッセイは、生体に対する化学物質の毒性などの影響を直接的に評価できることから医薬品のスクリーニングなどに利用されている。しかしながら、操作が煩雑で分析に長時間要することから、これらを軽減するため μ -TAS を利用したオンチップバイオアッセイの開発が期待されている。そのさい、細胞の機能を発現できる微小空間の構築とともに、少量の試料で多検体・多項目のアッセイを同時に実行できる高性能なアッセイフォーマットが求められるが、現状では微小空間での細胞の集積化および機能発現などの基礎的な研究にとどまっている。

本論文の目的は、高性能なアッセイフォーマットの開発を目的として、多検体・多項目の一斉分析が可能な新しいオンチップアッセイフォーマットを考案し、オンチップバイオアッセイに応用することにある。また、本オンチップアッセイの分析システムとしての特徴を明らかにする。さらに、微生物を用いる変異原性試験に応用し、その実用性を明らかにすることが本論文の目的である。

本論文は7章から構成されており、第1章では本研究の背景と目的について述べられ

ている。以下に著者が見出した主要な成果を述べる。

(1) 細胞を固定化する貫通孔（ウェル）をアレイ状に配置したチップと試料を導入するチャンネルを平行に配置したチップを組合せ、そこに形成される3次元微小流体ネットワークを利用した新規オンチップバイオアッセイフォーマットを考案した。考案したフォーマットにおいて発現ルシフェラーゼによる生物発光(BL)の測定を行った。その結果、モデル大腸菌の種類および発現誘導物質であるマイトマイシン C(MMC)の濃度の組合せに応じた強度の異なる BL を一組のチップ上で一斉に検出し、本フォーマットによるオンチップバイオアッセイが可能であることを明らかにした。

(2) 本オンチップアッセイの分析システムとしての特徴を明らかにするために、アッセイプロセスの速度論的モデルを提案し、BL 反応を用いてその解析を行った。オンチップアッセイでは、チップ内に供給された被験物質や酵素基質が、微生物を保持するゲルと細胞膜を透過し、細胞内で反応するプロセスとなっている。BL 応答曲線から各プロセスの速度定数を求めたところ、物質の膜透過プロセスが発光応答時間や分析感度に影響を与える主要因であることを明らかにした。

(3) 本オンチップフォーマットを SOS 応答に基づくルシフェラーゼの遺伝子発現を指標とした変異原性試験に応用した。変異原物質として MMC を用い、培養液を用いる従来法と比較した。その結果、従来法と同様の用量反応曲線が得られ、検出下限も同程度となった。その他の代表的な変異原物質についても同様の結果が得られた。また、分析時間に関しては、従来法の約 1/4 に短縮することができた。以上の結果から、本フォーマットが SOS 応答に基づく変異原性試験に有用であることを明らかにした。

(4) 高濃度の菌体を微小空間内に固定化した場合にその死滅が促進されることに着目し、致死感受性を指標としたオンチップフォーマットの変異原性試験を新たに考案し、本フォーマットに適用した。MMC を用いて検討したところ、二つの試験菌株の生存率の違いを BL 強度に基づいて算出することが可能となり、致死感受性に基づく変異原性試験が可能であることを明らかにした。なお、分析時間は約 3 時間となり、数日間を要する従来法から大幅な分析時間の短縮が可能になることを明らかにした。

これを要するに、著者は高性能なオンチップアッセイフォーマットとして、複数のチップで構成される微小流体ネットワークを用いる方法を考案し、変異原性試験などの実用分析に応用することにより、ハイスループットなオンチップアッセイシステムを開発したものであり、生物機能化学および生物計測工学の発展に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。