

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 本田 信吾

マイクロタイタープレート上での生化学アッセイは、生体分子の機能解析における常套手段として広く用いられる。一方で、この手法で分かるのは多数の分子の性質の平均値であり、個々の分子の情報は失われる。この問題に対し一分子計測技術は、個々の分子の情報へのアクセスを可能にし、例えば従来の生化学アッセイでは見えなかった分子集団の不均一性を明らかにしてきた。

デジタルバイオアッセイは、核酸やタンパク質などの生体分子にとどまらず、細胞・ウイルスなどの生体粒子の機能をも一分子・一粒子の解像度で評価可能な計測技術である。均一体積の微小リアクター（例：油中水滴、チャンバーアレイ）を多数用意し、計測対象を確率的に封入することで一分子・一粒子を単離し、ハイスループットに各種解析ができる。一方で既存のデジタルバイオアッセイでは、計測対象に対し、単一パラメータについて、単一条件でしか計測できないため、多条件計測や多パラメータ計測に対応していない。この制限により、例えば酵素反応におけるミカエリス・メンテン定数や阻害剤への応答性といった基礎的な情報すら、一分子・一粒子計測においては得ることができない。これは計測対象をリアクター内に保持できないこと、封入に用いるオイルが洗浄できず、溶液交換を妨げることによる。先行研究において、洗浄可能なミネラルオイルでチャンバーアレイを封入することで溶液交換が実現されているが、チャンバー上にオイルが残るため溶液交換が数回に限られ、さらに疎水性分子がミネラルオイルに漏れ出すという問題があった。

本論文では、チャンバーアレイ内に計測対象を固定化し、エアで封入することで、溶液交換可能かつ漏れ出しのない「多次元」デジタルバイオアッセイを開発した。そしてウイルス粒子および酵素分子の定量的な多条件・多パラメータ計測を実証した。さらに本システムに酵素工学に展開。溶液交換可能な新しい酵素スクリーニングシステムを構想・設計し、最大の技術的ハードルである DNA と酵素の固定化および多条件計測を実証し、実現への道筋を示した。

本論文は全 6 章構成となっており、第 1 章では序論として既存のデジタルバイオアッセイとその応用、そしてデジタルバイオアッセイによる多条件・多パラ

メータ計測の現状とその課題、最後に課題解決に向けた技術的ハードルについて整理した。

第 2 章では、多次元デジタルバイオアッセイのシステム構築を行い、構築したシステムが三つの要求性能である (1) 溶液の安定性 (2 h 以上安定)、(2) 溶液の独立性 (2 h 以上チャンバー間のクロスコンタミネーションなし)、(3) 溶液交換の完全性 (30 回以上の完全な溶液交換が可能) をすべて満たし、定量的な多条件・多パラメータ計測に堪えることを示した。

第 3 章では、構築したシステムによる多条件計測の実証としてインフルエンザウイルス (IAV) 一粒子ごとの阻害剤応答性の計測を行い、阻害剤応答性がウイルス粒子ごとにばらつきを有していることを初めて定量的に明らかにした。さらに多パラメータ計測の実証として、構造の異なる二つの阻害剤に対するウイルス粒子ごとの阻害剤応答性を一度に計測することにも成功した。今後この計測技術により、IAV の集団内で阻害剤耐性株がどのように発生し卓越していくのか、一粒子レベルの解像度で明らかにできる可能性を示した。

第 4 章では、構築したシステムによる酵素一分子の多条件・多パラメータ計測を実証した。二つの阻害剤に対する 2 種の酵素アルカリフォスファターゼ (ALP) の応答性を一分子ごとに計測し、得られた多次元情報に基づいて 2 種の ALP を判別することに成功した。ここで実証された一分子レベルの酵素判別が、疾患の高精度臨床診断につながる技術であることを示した。

第 5 章では、構築したシステムの酵素工学への展開を目指し、溶液交換および多条件計測が可能な新しい酵素スクリーニングシステムの設計と実現可能性の検証に取り組んだ。まず DNA と酵素をチャンバーに固定化するアプローチで溶液交換が可能であることを示した。そして実際のスクリーニングを想定した実験で、多条件計測に基づいてチャンバーに固定化した二つのモデル酵素 (S-EcALP_{G118D}, S-EcALP_{D101S}) を判別できることを実証した。最後に実現に向けた課題抽出を行った。

最後に第 6 章では、まず第 5 章までを総括した後、本論文にて開発・その有用性が実証された多次元デジタルバイオアッセイの学術的・工学的意義と今後の展望、そして課題について議論した。

以上のように、本論文で報告された多次元デジタルバイオアッセイは、計測技術および酵素工学技術の両側面において、既存のデジタルバイオアッセイの限界を拡張する革新的な技術であると言え、今後学術界のみならず、産業界においても大きなインパクトを与える可能性が高いと考えられる。

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。