



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | マイクロリアクターを用いた遺伝子発現計測に関する研究                                                                                                                      |
| Author(s)    | 平田, 克樹                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 2013, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/60002">https://hdl.handle.net/11094/60002</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【35】

|               |                                                                        |
|---------------|------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 平 田 克 樹                                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士（情報科学）                                                              |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 5 8 7 2 号                                                          |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 25 年 3 月 25 日                                                      |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>情報科学研究科バイオ情報工学専攻                                       |
| 学 位 論 文 名     | マイクロリアクターを用いた遺伝子発現計測に関する研究                                             |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 四方 哲也<br>(副査)<br>教 授 清水 浩 教 授 前田 太郎 教 授 松田 秀雄<br>教 授 若宮 直紀 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

遺伝子発現は生命の根幹的な反応であるが、その産物であるタンパク質量や活性は細胞毎に大きくばらつく。この遺伝子発現のばらつきは細胞分化や環境適応に寄与することが指摘されており、そのメカニズムを探る研究が広く行われている。しかし、細胞では他の代謝反応や機能未知の成分が混在しており、反応が持つ基本的な性質としてのばらつき細胞が持つ複雑な構造や仕組みに起因するばらつきが混在して現れる。このような細胞を用いた研究（in vivo研究）と並行して、生化学のアプローチ（in vitro研究）により、多くの生物学的現象に関わる分子メカニズムが明らかにされた。in vivo研究とは異なり、再構築系には未知の成分がなく成分の組成を任意に変えられる。それゆえ、定義された反応系の構築は複雑な反応ネットワークの体系的で包括的な理解の助けとなる。

本研究では、細胞でみられる遺伝子発現のゆらぎをin vitroで再構築するため、①遺伝子発現計測のためのマイクロリアクターの作製と条件検討を行い、②統計的な速度論解析の結果とシミュレーションからばらつきを記述するモデルを提案する。その道具立てとして、マイクロリアクターとして広く用いられている油中液滴系とチャンパー系を並列に比較し、再構成型転写翻訳系PUREsystemを用いた遺伝子発現の反応タイムコース

を観測するのに適した条件を実験により明らかにした。両者を比較した結果、コントロール実験で反応のばらつきが小さいチャンバー系をマイクロリアクターとして採用した。これを用い、小さな反応体積内における遺伝子発現反応のばらつきの挙動を解析した。RNAポリメラーゼ濃度条件によって遺伝子発現のばらつきが変化し、確率的な反応素過程だけでは説明できない場合があった。試験管内遺伝子発現でも知られる翻訳失活の影響を考慮した解析を行うと、実験の反応タイムコース、および反応のばらつきの変動係数や加水分解産物濃度分布の時間変化がよく説明された。マイクロリアクター内における遺伝子発現のばらつきは確率的な反応素過程と翻訳失活の影響を考慮する必要があることを明らかにした。

マイクロリアクター内における遺伝子発現のばらつきを評価し、そのばらつきの理解に役立つプラットフォームを構築した。この新たなin vitro実験系により、細胞集団で報告されているゆらぎの大きさや分布形状の挙動を、単純化したモデルから説明する新たな枠組みを提示した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、マイクロリアクターを用いた遺伝子発現計測に関する研究について述べている。生化学は、精製・抽出または合成した生体分子および関連の成分を試験管内に再構成することで細胞内の化学反応を究明する学問分野である。しかし、通常試験管はラージスケールであり、細胞は直径数マイクロメートル程度の反応容器であることを考えると、試験管内反応が細胞内で起こっている現象と必ずしも一致しないという指摘がある。平田氏は、マイクロ加工技術を導入し、細胞に近いサイズの反応容器の中での生化学反応の挙動を調べた。具体的には、生命活動のセントラルドグマと呼ばれる遺伝子発現反応について、微小な反応容器内での反応タイムコースの平均的变化およびそのゆらぎを評価することに成功した。

2、3章では、Water-in-Oilエマルションおよびガラス製のマイクロチャンバー中での遺伝子発現反応のタイムコースを計測する実験系の構築を目指し、条件検討及び両者の長所・短所の比較を行った。検出感度、計測時間、区画化が反応に与える影響など多数の項目にわたって検討を行い、その結果として遺伝子発現反応タイムコースの高感度計測には、密閉性に優れるマイクロチャンバーが適していることを示した。一方、ハイスループット計測にはエマルション系が適していることも指摘し実験的に証明した。

4章では、上で選択したガラスマイクロチャンバーを用い、反応に関与する分子数が少数になる条件下での遺伝子発現反応揺らぎの評価を行った。100以上のマイクロチャンバー内反応の計測結果より統計量を算出し、理論モデルと組み合わせて評価することでゆらぎが発生するメカニズムを記述した。

この取り組みはマイクロ加工という工学技術と、生化学実験を組み合わせた融合研究であり、学問の新しい方向性を切り拓く先鞭的研究として価値がある。遺伝子発現という多段階化学反応のゆらぎの挙動を世界に先駆けて報告しており、内容もよく練られたものである。

よって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として価値のあるものと認める。