「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」
平成 20 年度採択研究代表者

H22 年度
実績報告

一木隆範

東京大学大学院工学系研究科・准教授

ナノバイオチップ技術を利用する高速酵素分子進化システム創製

§1. 研究実施の概要

本プロジェクトは、高速分子進化工学のパラダイムと技術にナノバイオチップ、1分子計測技術を融合することにより、酵素反応などの複雑な生化学反応における生体分子機能を効率良く大量にスクリーニングし、進化させることが可能な世界初のシステムの実現を目指している。システムの根幹となる技術は分子のアフィニティを on/off で評価する DNA チップやプロテインチップを補完する生体分子機能高効率スクリーニング（HTS）技術である。マイクロリアクターアレイを仮想細胞閉鎖空間（セル型リアクター）として利用することで、従来は困難であった重要な生化学反応である酵素機能（分子間の弱い相互作用）の評価を可能にし、さらに微小リアクター空間の利用が原理的にもたらす反応の迅速化、検出の高感度化、計測の大規模並列化といった特徴を最大限に活用する。H22 年度は、変異 cDNA ライブラリを大規模マイクロアレイチップとして実装する技術、マイクロインタリオプリンティング法と無細胞合成系を利用した cDNA マイクロアレイチップからタンパク質マイクロアレイへの変換技術を構築した。他に、量産可能な 1 分子イメージング用ナノ開口チップの開発、チップ上分子の選択的回収技術の開発を進めている。H23 年度には緑色蛍光タンパク質を用いて我々が提唱する高速分子進化システムの技術的有用性を確認するモデル実証実験を達成する予定である。

§2. 研究実施体制

(1)「一木」グループ

①研究分担グループ長：一木 隆範 （東京大学大学院工学系研究科、准教授）

②研究項目

1. 酵素分子進化リアクターのためのプラットフォームの開発
2. チップ上での核酸からの無細胞合成によるタンパク質分子のマイクロアレイ化技術
3. 蛍光アッセイプラットフォームの開発

(2)「根本」グループ

①研究分担グループ長：根本　直人　（埼玉大学理工学研究科、准教授）

②研究項目

1. cDNA display（cDNA-タンパク質連結）技術に必須なリンカーのデザイン・試作

2. セルラーゼの分子進化モデルの構築

3. 分子設計・酵素アッセイの予備的検討

(3)「船津」グループ

① 研究分担グループ長：船津　高志　（東京大学大学院薬学系研究科、教授）

② 研究項目

・タンパク質機能の1分子イメージングによる高感度スクリーニング法の開発

1．ナノ開口を使った1分子蛍光イメージング法の開発

2．1分子蛍光イメージング法による酵素活性の定量法の開発

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4－1)に対応する)

一木グループ

1. 大規模 cDNA マイクロアレイチップ作製技術の開発

油と水と界面活性剤を攪拌させることにより形成する W/O エマルジョンの限られた反応空間中で鋳型 DNA を増幅させるエマルジョン PCR 法は 1 分子 DNA を増幅し、1つのビーズ担体表面上に固定する技術である(BEAMing 法)。当該手法と、我々の研究室で開発した自己組織化による磁気ビーズの集積化技術を融合させることにより、25 メガの cDNA ライブラリーをアレイ状に集積したチップが作製できることを示した(特願 2010-216955)。昨年度検討したエマルジョンの粒径分布を考慮した濃度調製法を用いて 1 分子エマルジョン PCR の条件を最適化し、蛍光標識した 2 種類の cDNA を固定化した 2.8μm 径の磁気ビーズを大量に作製した。この磁気ビーズを 25 メガのマイクロウェルアレイを形成した PDMS チップ上に展開し、チップ下部に配置した磁石を走査して磁気ビーズをチップ上で移動させながら自己整合により、短時間でマイクロウェルアレイ内に磁気ビーズを配列した。従来のマイクロスポッティング法では cDNA ライブラリー数が $10^{3\sim4}$ であったのに対し、今回開発した技術により $10^{8\sim9}$ に及ぶ大規模集積化を可能にするものであり、進化分子工学で扱う必要のある大規模変異体ライブラリーをチップ上で扱うための重要な基盤技術が達成された。

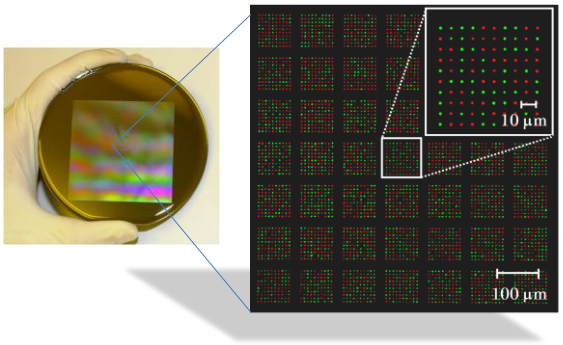

図1. DNA を表面に固定化した担体ビーズを自己組織化により配列した DNA アレイチップ. メガ・ギガスケールの変異 DNA ライブラリーのアレイ化に対応可能な技術である.

2. マイクロインタリオプリンティング技術と無細胞合成法を用いた cDNA アレイからタンパク質アレイへの変換技術の開発

磁気ビーズ担体を利用した cDNA マイクロアレイチップから、タンパク質マイクロアレイチップへの直接変換技術の開発を行っている[1)]。本年度は、マイクロインタリオプリンティング技術と無細胞翻訳システムおよび His タグを利用したプロテインアレイチップの作製方法を開発した(特願 2010-191060)。

モデル実験のため、green fluorescent protein(GFP)の cDNA にビオチンのついた His タグ cDNA をハイブリダイゼーションさせ、GFP-His タグ cDNA を形成した。ストレプトアビジンで表面

修飾された直径 40 μm の磁気ビーズに GFP-His タグ cDNA を固定し、マイクロウェルアレイチップ上(直径 60 μm,深さ 45 μm) に自己整合配置した。このチップ上で無細胞合成溶液を展開し、Nickel -nitlirotriacetic acid(Ni-NTA)で表面修飾したガラス基板上に密着させた。マイクロウェル内ではビーズ上の cDNA から転写と翻訳の反応が同時に進行し、GFP-His タグタンパク質が合成され、His タグを介して GFP は基板上の Ni-NTA と結合する。以上の工程により、cDNA マイクロアレイチップ上で合成されたタンパク質が一括で基板上に固定され、プロテインマイクロアレイチップの形成が可能であることを示した。

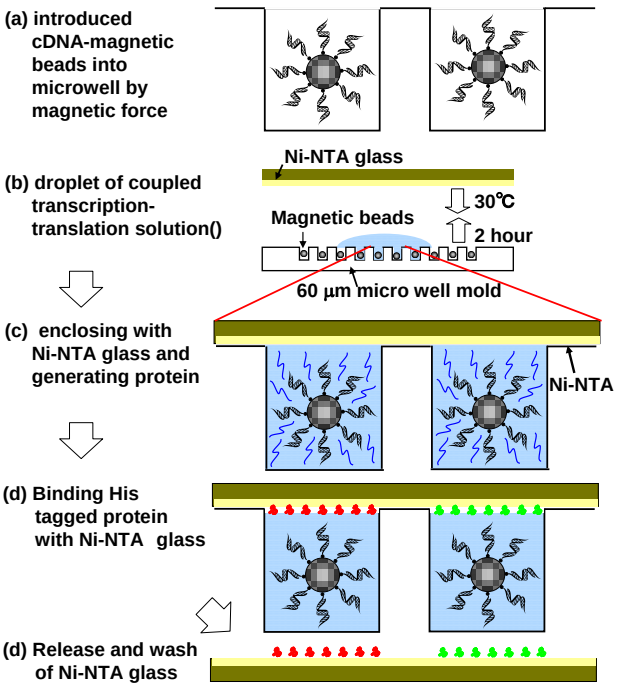

図 2. マイクロインタリオプリンティング法と無細胞合成系を用いたプロテインマイクロアレイチップ形成法.

根本グループ

1. cDNA display(cDNA-タンパク質連結)技術に必須なリンカーのデザイン・試作

マイクロリアクターアレイ上でタンパク質を発現・固定化する際に重要なピューロマイシン・リンカーの改良を行った。前年度、ビオチン部分の切断に使用する酵素を制限酵素 PvuII から RNA 分解酵素 RNaseT1 に変更し、配列設計を最適化することによって cDNA-タンパク質連結体の作製時間を大幅に短縮することが出来たが、RNA 分解酵素の実験系への残留・混入によって、cDNA-タンパク質連結体作製過程で用いる RNA 分子が分解されてしまう懸念があった。また、リンカー配列中に RNA が挿入されていることから、翻訳反応液中に存在している RNA 分解酵素によってリンカー自体が分解される可能性もある。そこで、切断酵素として損傷

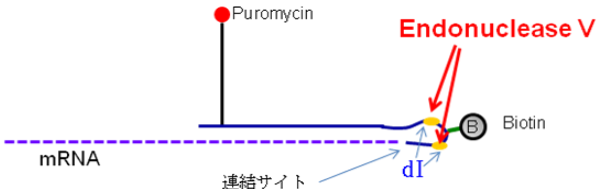

図 3. リアカーの模式図
固相結合部位であるビオチンを挟んでデオキシイノシンが配置してあり、Endonuclease V によって切断される。

DNA の修復酵素 Endonuclease V によって特異的に認識・切断される dI(deoxy-Inosine)を RNA の代わりに挿入したリンカー（図 3）を試作し、その効果を検証した。その結果、今回作製したリンカーは、以前のものと同様の切断効率、タンパク質連結効率を有しつつ、RNase 耐性を持っていることが確認できた(図 4)。このように、ハイスループットスクリーニング可能で、かつ化学安定性も向上したリンカーを作製した。このリンカーは、耐熱性酵素等を獲得する上で必要となる厳しい実験条件での使用が可能であることから、重要な技術であるため特許出願した(特願 2011-608)。

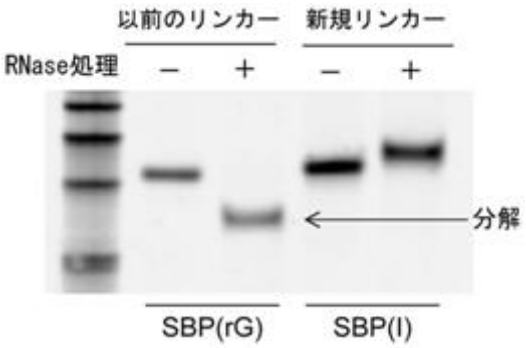

図 4　新規リンカーの RNase 耐性
以前のリンカーは一般的な RNase で分解されるが、新規リンカーは分解されない

2. セルラーゼの分子進化モデルの構築

1） GFP 変異体ライブラリの cDNA display 化

モデル実験用に DNA シャフリングによって終止コドンがランダムに挿入された変異体 GFP を昨年度構築した。本年度はこれを実際のモデルスクリーニングに用いるために cDNA display 用のコンストラクトに再構築した。現在、これを用いて一木グループでモデル実験を検討中である。

2） サブチリシン酵素の試験管内進化実験

cDNA display 法を通常の親和性に関する in vitro selection 法に適用する方法論は本研究の中でもさらに深化させた[3), 4)]。その結果、RNA リボザイムのように試験官内で触媒機能を進化させる方法論も開発できる可能性が示唆された。これは本テーマの on-chip 上での酵素機能進化を補強し、あるいは、on-chip 上では取得しにくい酵素機能を取得できる可能性もあるため、酵素進化用のピューロマイシン・リンカーのデザイン、及び、そのモデルとしてのサブチリシン酵素のクローニングを行なった。

3. 分子設計・酵素アッセイの予備的検討

取得された改変酵素の特性を精確にハイスループットに解析する手法として、船津グループと FRET による酵素機能解析を検討している。そこで重要となる基質であるセロビースに蛍光基質（テトラメチルローダミン）を付加した化合物（図 5）を、根本グループの松岡准教授が合成した。

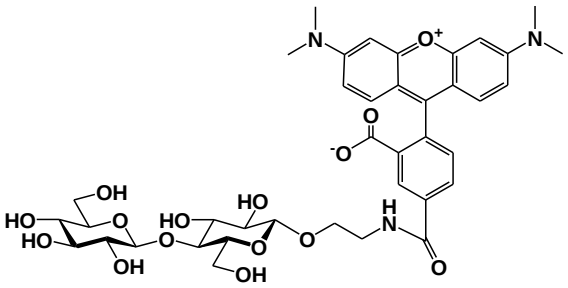

図 5 FRET 用蛍光付セロビオース

船津グループ

1. ナノ開口を使った1分子蛍光イメージング

前年度までの研究により、1分子イメージングに適したナノ開口の形状を最適化することができた。問題として残ったのは、作製に電子ビームを用いるため大量に生産できないことである。これを解決するため、ナノインプリントと紫外線露光を組み合わせることでナノ開口を量産できるようになった。

ナノ開口に Alexa488 で蛍光標識した GroES を固定し、Cy3 標識した GroES と Cy5 標識した GroEL を溶液中に漂わせ、GroEL と GroES の反応サイクルを1分子イメージングした。その結果、「GroEL の 2 つのリングに補因子の GroES が交互に GroEL に相互作用することで機能する」という従来の反応モデルに反して、GroEL の 2 つのリングに GroES が同時に結合した状態(フットボール型複合体)を捉えることに成功した[2)]。2 つ GroES がどちらのリングからも解離することと、この複合体の寿命が約5秒であることが解った。これは従来のシャペロニン反応サイクルのモデルに修正を迫る発見である。

また、マイクロチップ内で生体分子を含む溶液の流れを制御する方法についても開発を行った[3),4)]。

2. GFP の蛍光特性の評価

GFP が合成されてから蛍光を発するようになるまでの過程で律速になっているのは酸化による蛍光団の生成過程である。この速度を測定するため、GFP を酸素除去酵素系を含む無細胞翻訳系(pure system)で合成し、酸素を含む溶液に希釈することで酸化反応を開始させた。様々な GFP 変異体を用いて時定数を比較したところ、野生の GFP は 55 分であるのに対して、最速は GFPm の 6 分だった。また、1分子の GFP の蛍光強度を測定することと、1分子の GFP の蛍光スペクトルをプリズム分光することにも成功した。

3. セルラーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発

セルロースを分解する過程で有効な酵素が望まれているのはセルビオースを分解する過程である。この反応を進めるβ-グルコシダーゼの酵素活性を高感度に評価する方法の開発を行っている。β-グルコシダーゼとして BGL1B を選択し、C 末端 63 残基を欠失させた変異体を大腸菌で発

現する系を確立した。内在性のシステインを他のアミノ酸に置換し基質に近い位置にシステインを導入し、これを蛍光標識した。この酵素と基質の結合を検出するため、根本グループの松岡准教授が合成したローダミン標識したセロビオースを使用した。

§4. 成果発表等

（4－1） 原著論文発表

●論文詳細情報

1. M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki, “DNA-linked protein array for high-throughput proteomics: from spatially unknown DNA arrays to identifiable protein arrays” *Nano LIFE*, Vol.1, pp. 33-43 (2010) (DOI: 10.1142/S1793984410000031)
2. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, J. Wada, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Tanii and T. Funatsu, “Single-molecule study on the decay process of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides”, J. Biol. Chem., vol 285, No. 30, pp. 23159-23164, 2010 (DOI: 10.1074/jbcM110.122101)
3. K. Ozaki, H. Sugino, Y. Shirasaki, T. Aoki, T. Arakawa, T. Funatsu and S. Shoji, “Microfluidic cell sorter with flow switching triggered by a sol-gel transition of a thermo-reversible gelation polymer”, Sensor Actuat. B-Chem. vol. 150, Issue 1, pp. 449-455, 2010 (DOI: 10.1016/j.snb.2010.07.024)
4. H. Sugino, T. Arakawa, Y. Nara, Y. Shirasaki, K. Ozaki, S. Shoji and T. Funatsu, “Integration in a multilayer microfluidic chip of 8 parallel cell sorters with flow control by sol-gel transition of thermoreversible gelation polymer”, Lab Chip, vol. 10, pp. 2559-2565, 2010 (DOI: 10.1039/c004192k)
5. M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki, K. Nishigaki, Y. Husimi, “Gel shift selection of translation enhancer sequences using messenger mRNA display” *Anal. Biochem.* vol.409, pp.105-111 (2010) (DOI:10.1016/j.ab.2010.10.002)
6. M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, “Microintaglio printing of mRNA and its application to in situ production of mRNA display microarray”, *Appl. Phys. Express,* vol. 4, 047001 (2011) (DOI: 10.1143/APEX.4.047001)
7. J. Wada, S. Ryu, Y. Asano, T. Ueno, T. Funatsu, T. Yukawa, J. Mizuno, T. Tanii, “Fabrication of zero-mode waveguide by ultraviolet nanoimprint lithography lift-off process”, Jpn. J. Appl. Phys. (in press)

（4－2） 知財出願

① 平成22年度特許出願件数（国内 5 件）

② CREST 研究期間累積件数（国内 6 件）