

プログラム名：「豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを  
実現する人工細胞リアクタ」

PM名：野地博行

プロジェクト名：「つくる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

アレイ型人工細胞デバイスと進化分子工学的手法を組み合わせた最適・最高  
の活性を有する生体分子（酵素）スクリーニング技術の開発

研究開発機関名：

東京大学

研究開発責任者

野地 博行

## I 当該年度における計画と成果

### 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

遺伝子発現機能を搭載したアレイ型人工細胞デバイスを用いて、 $10^5$ の種類から機能が大幅に増強された生体分子（酵素）のスクリーニング法を開発する。スクリーニング法の開発にあたっては、人工細胞デバイスの各リアクタに異なる遺伝子（モデル分子として臨床診断用酵素を用いる）を一分子だけ導入し無細胞酵素合成を行い、発現した各酵素を分解産物の蛍光強度で定量評価し、機能向上した分子を選択、そのサイクルを数回繰り返すことにより最適分子（遺伝子）を創生（同定、抽出）する。本年度は以下の達成目標を掲げた。

#### ①スクリーニング技術開発

##### 1. 人工細胞デバイスと無細胞タンパク質合成系の組み合わせによる酵素発現技術の確立

- 1)  $10^5$ のフェムトリットルサイズリアクタの定量的画像解析技術の確立
- 2) フェムトリットルリアクタ内での無細胞タンパク質合成反応プロトコルの確立
- 3) リアクタ内で合成された酵素分子の変動係数（CV）20%以内の評価技術の確立

##### 2. スクリーニング技術の確立

高活性化アルカリフォスファターゼ（ALP）のスクリーニング技術開発への着手。

##### 3. 人工細胞デバイスからの遺伝子回収装置の開発

微小溶液チャンバーから遺伝子回収を行う装置の開発開始。

#### ②スーパー酵素開発

変異 DNA ライブラリの作成とスクリーニングされた変異 DNA を基にした 2 次スクリーニング用ライブラリ作成を課題 2D と連携して開始。

### 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

#### 2-1 進捗状況

本年度はプロジェクト開始年度であるため、最初に定量計測が可能なピックアップシステムを搭載した顕微鏡のセットアップから行った。続いて、定量的計測には人工細胞リアクタのサイズのばらつきなどを評価する必要があるため、画像解析によってその評価を行った(①-1-1)。さらに、リアクタ内での無細胞タンパク質発現系を機能させるための条件探索として、閉じ込めるオイルや界面活性剤の有無などの検討を行った(①-1-2)。実際の進化候補である ALP 分子をリアクタ内で合成させ、1 分子 DNA から合成された ALP 活性の CV についても評価を行った(①-1-3)。また、高活性型 ALP のスクリーニングに取り組むため、現状の濃縮率の見積もりを行った (①-2, ②)。スーパー酵素開発としては、ALP 以外にも高活性型の酵素の必要性が高いセルラーゼと  $\beta$ -グルコシダーゼの改変とスクリーニング手法の開発を課題 2F と共同で開始した (㊟)。また、スクリーニングのプロセスを自動化しハイスループット化するため、課題 4A と共同で自動スクリーニングシステムの開発を開始した (3)。

#### 2-2 成果

- ① - 1 - 1)  $10^5$ のフェムトリットルサイズリアクタの定量的画像解析技術の確立

定量的に画像解析を行うため、最初に顕微鏡における励起光のムラを取り除くため、光学系の調整と画像補整方法に関して検討したところ、画面上の複数の点における蛍光強度の CV が 1%~4%になることが分かった。この誤差が全ての計測にかかってくるノイズの部分になるが、十分小さいため、定量計測が可能であると考えられる。

① - 1 - 2) フェムトリットルリアクタ内での無細胞タンパク質合成反応プロトコルの確立

リアクタ内での 1 分子 DNA からタンパク質発現を安定的に行うため、無細胞タンパク質合成系を用いた合成反応の最適化を行った。最適化する条件は、使用する溶媒や界面活性剤、流路形状やスパーサーの厚みなどである。これら条件の探索を行ったところ、安定的にタンパク質発現ができる条件を見いだすことができた。これにより、 $\beta$ -galactosidase や ALP, GFP, CFP, YFP, mCherry など様々なタンパク質発現が可能となった。

① - 1 - 3) リアクタ内で合成された酵素分子の CV20%以内の評価技術の確立

モデル分子として ALP を用いて 1 分子 DNA からリアクタ内でタンパク質発現を行い、その活性を蛍光強度として計測することで評価を行った。蛍光強度のヒストグラムを作成し、その CV を計算したところ、12%であった。これにより、2 倍程度活性が変化すればその変化を検出出来ることが明らかとなった。

2. スクリーニング技術の確立

高活性型 ALP のスクリーニングを開始するに当たり、目的遺伝子の濃縮率に関して検討を行った。野生型の ALP 遺伝子に高活性型の遺伝子がある割合で混合し、スクリーニングを実施したところ、我々のスクリーニングシステムでは 1 万倍の濃縮率を達成することができた (十分に実用に耐える濃縮率)。

② スーパー酵素開発

スーパーALPを開発するため、課題 2D が作成した変異ライブラリの評価と実際のスクリーニングを行った。スクリーニングにおいては、1 回のスクリーニングで野生型の ALP の活性に対して 20 倍の活性を持つ変異 ALP を得ることができた。今後は、さらなる活性向上を目指し、本変異 ALP をベースにした新しいライブラリでのスクリーニングなども実施する。

2-3 新たな課題など

ライブラリ作成において使用する変異導入プライマーに問題があることが分かった。変異は、4 種の塩基がランダムで入るが、今回使用したものはチミンに偏っており、本来のライブラリサイズが得られていない。このため、再度変異導入プライマーを作成しなおして、スクリーニングを行う必要がある。

3. アウトリーチ活動報告

2016 年 11 月 5 日、日本生物物理学会市民講座『「人工細胞デバイス」はイノベーションを生み出すか?』において、本研究開発課題を紹介した。