

研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名： 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

2. 研究代表者： 一木 隆範（東京大学大学院工学系研究科 准教授）

3. 研究概要

進化分子工学の「考え方」とナノバイオの「技術」とを融合することに基づき、多様性創出のため野生型遺伝子に無作為に変異を導入して得た変異 DNA ライブラリーアレイに1対1に対応付けした変異タンパク質のライブラリーアレイを機能評価と選択的分子回収により人工的に淘汰し、優勢分子種を取得し、PCR 増幅する一サイクルを多段に回してハイスループットに進化サイクルを図って得た酵素などをスクリーニングし、進化させて有用酵素などの取得を可能にする世界初の分子進化システムを目指している。本研究では、一木、根本チームがスクリーニングする変異体酵素ライブラリーの大規模化に向けた諸要素技術の高度化を併せて進め、核酸・タンパク質の高密度アレイチップ製造を可能にするマイクロインタリオプリンティング法の開発を担い、一木、船津、根本の各チームは協同して高効率酵素アッセイに必要な発蛍光性基質を利用する反応系を構築し、一木、根本チームは企業と協同での大規模集積マイクロアレイチップ用イメージャーの開発、遺伝子情報の光回収技術の開発を行っている。

研究の概要は、油水エマルジョン中で行うPCR増幅技術を用いてDNAを1分子種ずつ増幅・固定した磁気ビーズを、研究代表者の独自技術である磁気ビーズ自己整合法によりウェルアレイチップ上に配列し、変異体DNAの大規模集積化($10^8 \sim 10^9$ /チップ)を達成し、さらに、DNAビーズアレイチップに無細胞合成系を作用させ、タンパク質アレイチップに一括変換した。続いて、緑色タンパク質GFPの変異体ライブラリーをモデルに用いて、蛍光イメージングにより評価、ランク付けした優性分子種(発蛍光性GFP)の遺伝子情報をビーズの選択的ピックアップにより回収し、これをPCR増幅して第2世代DNAライブラリーを構築した。すなわち、チップ上に集積したサブピコリットルのセルを利用して分子進化サイクルを進められることを示した。

4. 中間報告結果

4-1. 研究の進捗状況及び研究成果の現状

まず、分子進化サイクルのモデル実証として、GFP の 1 コドンにランダムな塩基配列を挿入した GFP 変異体ライブラリーからスクリーニングした高輝度蛍光 GFP を一億個のウェル全てに発現させる事に成功した。これは、セル型進化リアクター上で分子進化サイクルを行える本手法の正当性が証明されたことになり、大いに評価される。そして、前半の成果として分子進化工学的手法のハイスループット化を実現するために、チップ上での DNA の選択的回収、マイクロインタリオプリンティング法の開発、無細胞翻訳による分子合成と情報をアレイチップで再現、特に、mRNA ディスプレイアレイ作製のため、ビオチン結合ピューロマイシンリンカーを新たに開発し、mRNA とリンカーの結合を10分の高速で達成し、これをチオール結合光開裂型にしたことは高く評価される。更に、光開裂によって DNA を回収して得た試料を収めた60mm 角チップを約5分で全域走査して分解度 $1 \mu\text{m}$ で蛍光画像を、民間企業との協同開発によるEMCCDカメラを搭載した顕微蛍光スキャナーの開発によって達成した事も高く評価される。それ故、ほぼ目標を達成しており、その困難度から言えば期待以上の進捗である。また、装置システムの改良評価については想定以上の達成をしている。

4-2. 今後の研究に向けて

酵素分子進化システムの開発が可能になれば、バイオ燃料の高効率製造や酵素医薬品、バイオセンサーの高効率化などの技術に対してインパクトが大きく、本研究テーマの重要度は非常に高い。実際、機能タンパクや酵素の機構解明のために、手作業でミュレーションをかけている研究者は少なくないため、このようなシステムは生命科学への貢献が期待出来る。本チームには、それを支える各要素技術を開発する力量があり、実際に成果をあげている。今回はシステムの動作検証の段階までであったが、求められているのは「より良いもの」を分子進化により「造り出す」、「見つけ出す」ことにあるので、どのような「尺度」「評価基準」で選別を行うかが重要となる。これをシステムに組み入れる、それにより予想外の機能タンパクが見つかってくる、といったパフォーマンスを上げる、というような方向も考えて欲しい。なお、このままでは酵素の評価技術に留まってしまう恐れも有るので、酵素の性能評価、判断をどのようにして行くか。酵素の専門家との共同研究も考える必要がある。特に、現在着手しているバイオエタノール製造用酵素分子としての β -グルコシダーゼの研究に期待している。

4-3. 総合評価

世界に類をみないユニークなテーマであり、その成果は学術的にも応用技術としてもインパクトが大きい。テーマが壮大であるだけに、本研究で全てが解決するわけではなく、分子進化サイクルの実現の先鞭をつけ、その意味を明確に成果として示すことが重要である。今回の中間評価において、目標達成のために必要な要素技術は全て示された。すべての成果が最後の最後に見えてくるという計画でなく、小規模で良いので、この方法でいけば予定された成果があがりそうだとことを早い段階で一通り見せてくれることを望みたい。本来の目的は有用な酵素を発見する、あるいは進化させる、ということではないか。このためには発現したい目標を設定し、それに向けて酵素を進化させていく、という方向性を示すべきではないか。