

「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

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。目標とす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ず反応の迅速化、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。

最初の3年間でのマイルストーンとして、モデル分子である緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて我々が提唱する高速分子進化システムの有効性を実証することを設定し、H20 年度はこれに向けたチップ技術、cDNA ディスプレイ技術、高感度分子イメージングに関する要素技術の拡張、高機能化を研究した。

## 2. 研究実施内容

有用酵素の合目的進化を可能にする「セル型分子進化リアクターシステム」の実現に向けて、その開発に必要な要素基盤技術として、(1)セル型分子進化リアクタープラットフォームの開発、(2)cDNA ディスプレイ技術の拡張・高機能化、(3)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を進めていく。本年度に行った具体的な研究内容を研究グループごとに以下に示す。

### 1. チップ上での核酸からの翻訳によるタンパク質分子のマイクロアレイ化技術(一木グループ)

大規模な変異体酵素の機能を高効率でスクリーニングするために、大規模高密度に集積化し

たプロテインチップを製作する必要がある。この製作工程において必要な、マイクロアクタアレイチップの微細加工技術の開発<sup>1)</sup>、マイクロアクタチップを鋳型として用いた精密分子移送技術／分子増幅技術の構築を進めている。

ピューロマイシンリンカーを用いてアレイ化固定した mRNA チップから固相上での無細胞翻訳によりタンパク質アレイに変換する技術に関して、これまでに 96well プレートを用いた原理実験に成功している。本年度は当該技術を現状の mm スケールからさらに微細化するための技術を検討した。スケールダウンを図るため、反応性イオンエッチングにより直径 100  $\mu\text{m}$  のリアクターアレイをもつ高純度石英ガラス製チップを作製し、mRNA のハイブリダイゼーション、無細胞翻訳、抗体染色を行なう局所的な反応槽として用いた。まず、ビオチン標識 Linker DNA を streptavidin を介して biotin-PEG ガラス基板に固定化したチップを作製した。続いて、このチップ上に DNA (stop codon を持たない GFP) に無細胞転写を行い得られた mRNA をライゲーションした。その後、無細胞翻訳反応系(ウサギ網状赤血球抽出液)を調製し、ガラス基板上で無細胞翻訳を行った。最後に、KCl および  $\text{MgCl}_2$  をそれぞれ添加し、リボソーム内に進入した puromycin を、翻訳されたタンパク質と結合させた。翻訳された GFP の検出には Alexa Fluor 647 ラベル化抗体を用いた。タンパク質-抗体アレイの蛍光検出の結果を図1に示す。当初、ガラス基板へのタンパク質の非特異吸着や抗体の非特異吸着が検出の問題となっていたが、PEG の非特異吸着抑制効果、及びブロッキング剤を用いることで非特異吸着を抑制し、ガラス基板上でのタンパク質合成、さらに mRNA-Linker DNA-タンパク質複合体アレイの作製を達成した。

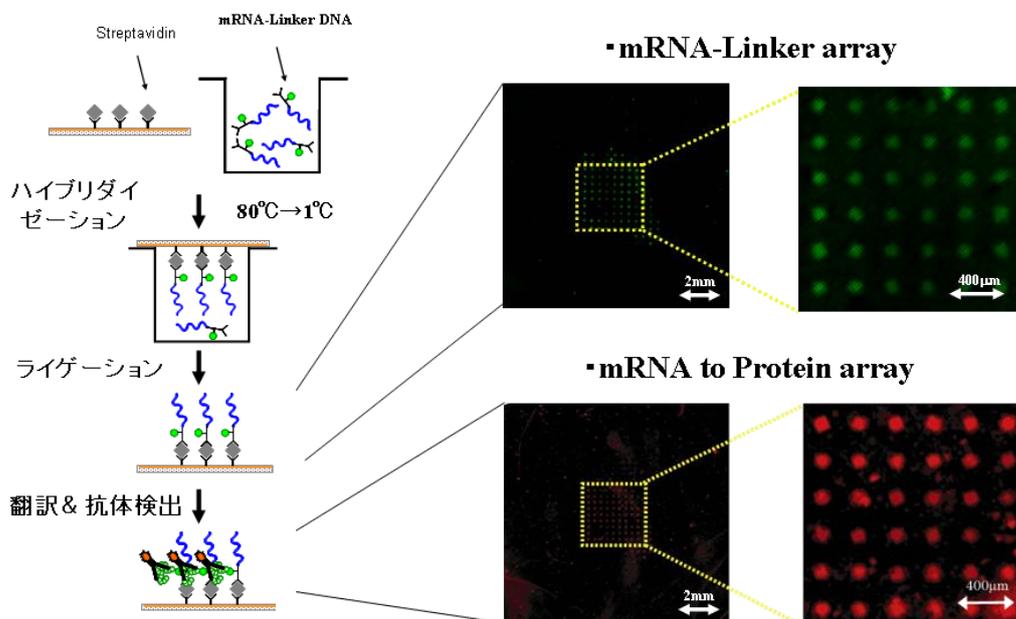


図1 mRNA-Linker 複合体の固定化とガラス基板上に固定化された mRNA-タンパク質複合体の  $100\mu\text{m}$  径パターンニング

さらに $\mu\text{m}$ レベルのスケールダウンを図るため、直径  $5\ \mu\text{m}$  のチップを用いて mRNA-LinkerDNA 複合体のガラス基板への固定化を行い、 $\mu\text{m}$  サイズのスポット 10,000 個の mRNA アレイのパターニングが可能であることを確認した。プロテインチップアレイについても同様にして微細化が可能と期待され、来年度も引き続き検討を行う予定である。

## 2. 分子マニピュレーションのための cDNA display 技術の拡張・高機能化及び分子進化モデル実験の構築(根本グループ)

マイクロリアクターのアレイ転写に必要な効率の良い DNA, RNA の固定化法及びタンパク質発現・固定化法を開発する。また、分子進化のモデル実験を構築する。この実現のために、主に(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の2つの課題を設定して研究を進めている。

マイクロリアクターのアレイ転写に必要な効率の良い DNA, RNA の固定化法及びタンパク質の発現・固定化法を検討した(図 2)。特に煩雑な精製プロセスはプロセス全体を通して実用化の大きな障壁となることから、(1)転写後精製を必要とする cap 構造を用いずに mRNA を安定化する方法、(2)mRNAとリンカーの結合に酵素(T4RNA リガーゼ)を用いない固定化 について検討し、(1)に関しては mRNA の 5' 末端に G-quadruplex 様配列を導入することで可能であることを見出した。(2)に関しては条件を工夫することで酵素による mRNA との連結なしに cDNA を固定化することに成功した。また、セルラーゼ酵素反応測定条件に関する予備的検討を行った。

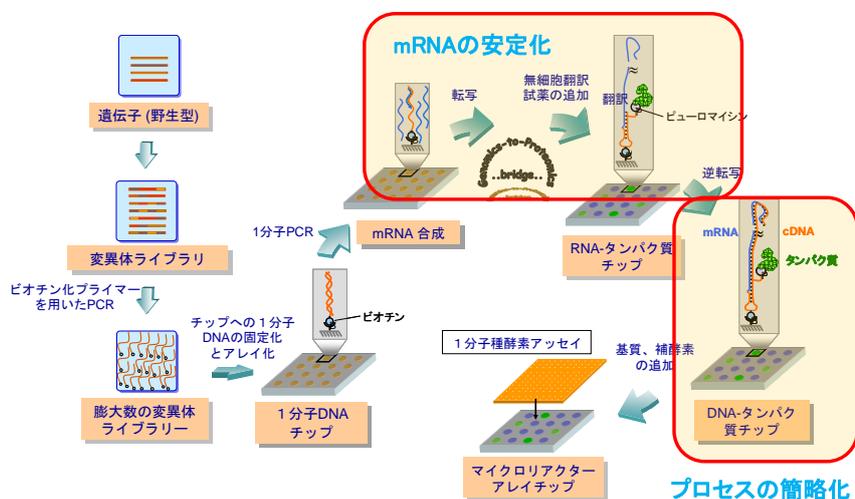


図2 DNA ライブラリから DNA タグ付酵素を配置したマイクロリアクターを作製する

## 3. 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(船津グループ)

マイクロリアクター、ナノリアクターのアレイのそれぞれに1~数分子のタンパク質(酵素)を固定し、酵素活性を高感度に定量し並列評価する技術を開発する。このために、(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を行っている。

### 1. ナノ開口を使った1分子蛍光イメージング法の開発

石英ガラス基板に直径数十ナノメートルの穴(ナノ開口)が多数開いた金属薄膜を蒸着し、これに光を照射することにより、局在化したエバネッセント場を発生させた。金属の材質としてクロムとアルミニウムを選択し、光照射時の温度上昇を検討した。直径 50, 80, 100 nm のナノ開口を試作した。アルミニウムで作製した基板を用いて蛍光1分子のイメージングに成功した。

### 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

蛍光標識した生体分子を1分子レベルでイメージングできる顕微鏡法を開発した<sup>2)</sup>。この顕微鏡システムとナノ開口を用いて、シャペロニン GroEL の酵素活性を1分子蛍光イメージングした。ナノ開口基板に GroEL を固定し GroES の結合と解離を1分子蛍光イメージングすることに成功した(図 3)。また、ガラス基板にリボソームを固定し、無細胞翻訳系を用いて GFP を合成し、GFP の蛍光を1分子イメージングすることに成功した。

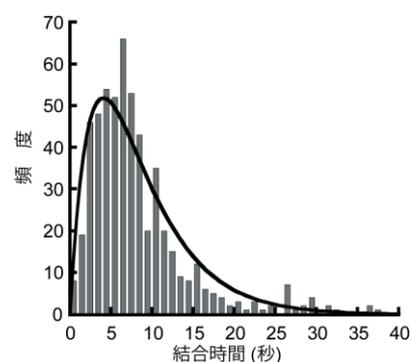


図3 GroELとGroESの結合時間のヒストグラム

## 3. 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 准教授)

#### ②研究項目

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

1. チップ上での核酸からの翻訳によるタンパク質分子のマイクロアレイ化技術
2. 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 准教授)

#### ②研究項目

cDNA display 技術の拡張・高機能化及び分子進化モデル実験の構築

1. cDNA display (cDNA-タンパク質連結) 技術に必要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) 船津グループ

①研究分担グループ長:船津 高志(東京大学 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

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表 (原著論文)

1. T. Ono, T. Akagi and T. Ichiki, "Anisotropic Etching of Amorphous Perfluoropolymer Films in Oxygen-Based Inductively Coupled Plasmas", *J. Appl. Phys.* 105, 13314 (2009).
2. Yo Ishihama and Takashi Funatsu, Single molecule tracking of quantum dot-labeled mRNAs in a cell nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 33-38 (2009) .
3. Y. Hosoi, T. Akagi and T. Ichiki, Development of microreactor array chip-based measurement system for massively parallel analysis of enzymatic activity, *Electronics and Communications in Japan*, (accepted).

##### (2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)