

「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。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。H21 年度は、GFP の大規模な変異体ライブラリをマイクロアレイチップとして実装するための分子固定用リンカーの開発、生体分子のプリント技術の開発、量産化に適した 1 分子イメージング用ナノ開口チップの開発等を行なった。H22 年度以降は選択的分子回収システムの開発にも着手し、23 年度内にモデル分子である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有効性を実証することを中間目標としている。

### § 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 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翻訳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 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 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)研究題目 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

#### (2)研究の目的および内容

有用酵素の合目的進化を可能にする汎用性の高い実用化技術の実現を目的とし、マイクロリアクターチップ技術を基盤とするタンパク質機能評価用プラットフォームの開発を行う。このために(1) 蛍光検出方式の高効率酵素アッセイ装置、(2) 1分子種機能の高感度計測に必要な分子増幅技術(チップ上翻訳技術ならびにエマルジョンPCRによるビーズ上への核酸固定技術)、(3) 1分子計測用ナノ開口チップを開発する。

#### (3)本年度の研究実施内容

##### 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

昨年度に引き続き、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とタンパク質アレイの高感度検出技術<sup>1)</sup>について研究した。マイクロリアクターアレイを利用した生体分子のアレイ状固定化技術については、昨年度までハンドプレス装置により加圧を行っていたため 1cm 角に満たない面積でしか実験ができなかったが、ナノインプリント装置を新たに導入し、実用化に必要な数 cm 角の大面积チップの試作実験が可能になった。さらに、既に提案しているマイクロプロテインアレイチップ作製プロトコールと作製効率等の比較検討を行うことを目的として、無細胞転写・翻訳共役反応系を用いて cDNA からの mRNA 転写、タンパク質翻訳を 1 ステップで行なう手法、タンパク質の末端に導入

したヒスチジンタグによるガラス基板上への固定化手法等の基盤技術を併せて確立した。

## 2. エマルジョンPCR技術を応用した1分子種DNAマイクロアレイ作製技術の開発

核酸、ビーズを分散させたエマルジョンを利用したPCR増幅法は、単一種のDNAを多数固定したビーズを容易に作製する技術として知られる。本研究では、当該手法を1分子種DNAマイクロアレイ作製に利用するため、比較的微量の試料でも対応可能な実験プロトコルを検討した。当該手法においてはビーズや鋳型DNA等の希釈濃度の最適化によりエマルジョン粒子中のビーズの数や鋳型DNA量を制御する必要があり、エマルジョンの粒子数ならびに粒径分布がこれらに影響するが、従来はエマルジョン粒径の分布を無視して濃度条件が決められているのが実情であった。本年度はエマルジョンPCRのプロトコルを確立する過程で、エマルジョン粒径分布の実験値をよく再現できる経験式; 
$$N = \sum_{d_i} \left( \frac{3Ve^{-d_A d_i}}{(2\pi d_i \Pi 0^3)} \right)$$
 (ここで、N: 粒子数, V: PCRmixの体積(・l),  $d_A$ : 平均粒径(・m),  $d_i$ : 粒径( $i = 1, 2, 3 \dots$ ・m))を見出し、これに基づいてより緻密に条件を最適化したエマルジョンPCRが可能になった。

## 3. 1分子蛍光イメージング用ナノ開口チップの開発

従来の金属薄膜にナノ開口を加工した1分子蛍光イメージング用チップに代わる製造の容易なチップの構造を提案し、その試作開発を行なった。このチップは、非晶質透明フッ素ポリマー(Cytop™、旭硝子(株))が有するポリマー由来の易加工性に加え、Cytopは可視光をほぼ吸収せず自家蛍光や光吸収による発熱の問題が生じない、更に水と屈折率がほぼ同じ(1.34)であることを利用する。昨年度、開発

したCytopのドライエッチング技術と本年度開発した表面親水化技術<sup>2)</sup>を用いてガラス薄板上に開口アレイを試作し、Cy5修飾した一分子タンパク質の蛍光計測を確認した(図1)。プロセス工程で生じる残渣、欠陥等に起因する蛍光ノイズが技術的課題となったが、Cytop表面の親水化工程で用いたArプラズマ照射に伴う紫外線照射がポリマー中に欠陥を誘起していることなどの原因が同定され、当該チップを用いる1分子イメージングのS/N比向上の指針が得られた。

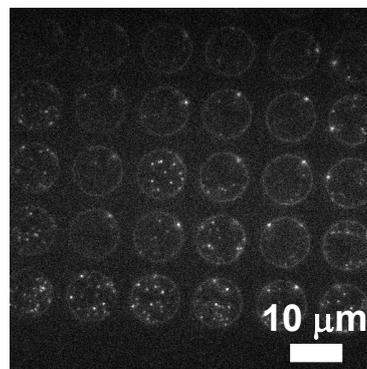


図1 デバイスを用いて観察したGroEL(370 pM)の一分子蛍光。励起波長: 635 nm、検出波長: 700±37.5 nm

根本グループ

(1) 研究題目 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

(2) 研究の目的および内容

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、主に次の3項目を設定する。

- 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) 本年度の研究実施内容

#### 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

根本が開発した cDNA ディスプレイ技術<sup>3)</sup>を、さらにマイクロリアクターアレイ上でのタンパク質の発現・固定化に最適化する目的でピューロマイシン・リンカーの改良を行った。新規リンカーはビオチン部分の切断に必要な酵素を制限酵素 PvuII から RNA 分解酵素 RNase T1 に変更した(図2)。これにともない制限酵素認識部位の代わりに DNA 中に rG 塩基がビオチン部分を挟む形で近接して2箇所を導入すればよいため合成に要する長さは半分になった。この結果、収量がほぼ2倍、コストは半分になり、複数のステップで反応効率を数倍以上向上させることができた。次に新規リンカーを用いてチップ上でタンパク質固定化するプロセス全般を検討した。その結果、1) mRNA とリンカーのハイブリダイゼーション 2) mRNA とリンカーの連結 3) 精製 4) 無細胞翻訳 5) mRNA-タンパク質連結 6) RNA カラム精製 7) 逆転写の各ステップで効率化し、従来すべてのステップには3時間を要していたが、これを25分で行うことが可能になり実用化に向けて大きく前進した。特に今回プロトコールを綿密に検討したところ従来必須と考えられていた6)の RNA カラム精製が図3のように割愛できることを見出した(精製しなくても mRNA-タンパク質連結体の合成量は同じ)。これは本研究のようなバッファー交換が比較的難しいチップ上の小体積リアクターでは大変有利な技術となる。また、一般的に cDNA display 技術をハイスループット化する上でも重要な知見であるため特許出願した(特願 2009-219348)。

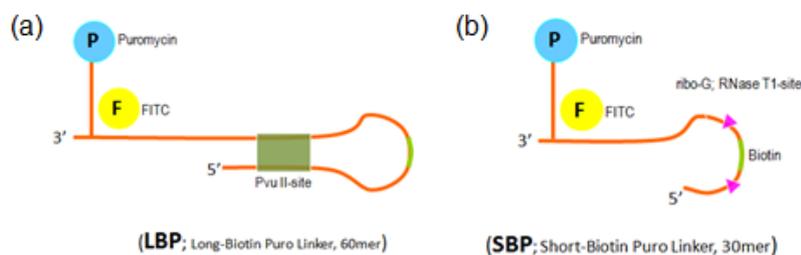
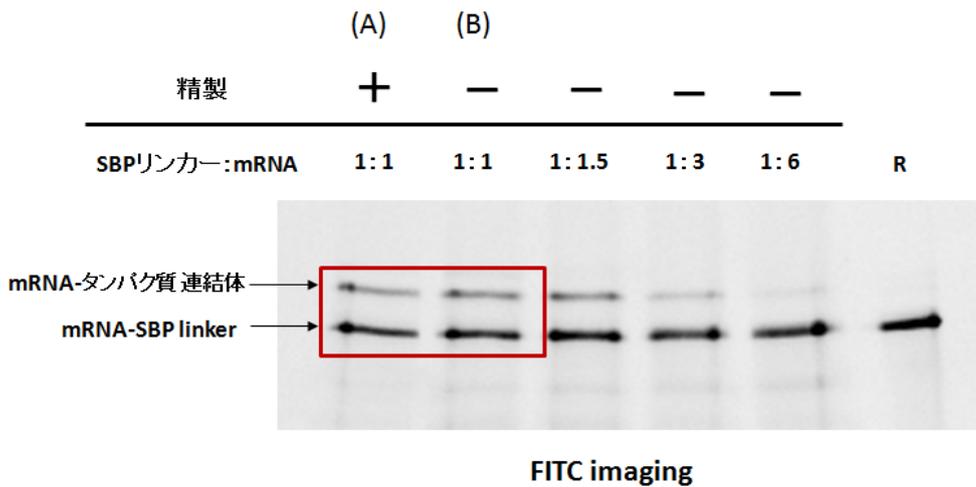


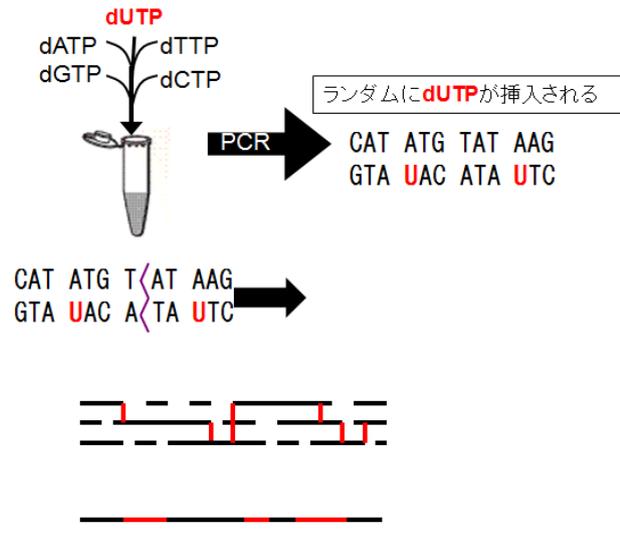
図2 リンカーの模式図 (a) 従来のリンカー (b) 新規リンカー



**図3 mRNA-タンパク質連結体形成と精製プロセスの有無**  
 SBPリンカーとmRNAを等量連結したものを無細胞翻訳系で合成する際に、余分なリンカーの除去と酵素反応溶液交換のためにRNA精製カラムが必要とされた (A)。今回、酵素反応をしたSBPリンカーとmRNAを連結した反応溶液をそのまま無細胞翻訳系に投入して合成した (B)。

## 2. セルラーゼの分子進化モデルの構築

本研究では従来にない膨大な配列空間からのスクリーニングが可能になるため、高頻度のランダム変異が導入されたライブラリを調整する必要がある。現在までのところこのような変異導入技術として最も成功を収めているDNA shuffling (DNA シャuffling)法を採用し、GFPをモデルとしてライブラリを調整中である。DNA シャuffling法では変異率の調整が難しいということが指摘されており、今回、変異率の調整が容易なdUTPを用いたDNA シャuffling法により変異導入のプロトコールを検討した。その結果、dUTP含有量に依存してシャuffling効率を調整できることがわかった。



**図4 dUTPを用いたDNAシャuffling法**

## 3. 分子設計・酵素アッセイの予備的検討

糖鎖合成を専門とする埼玉大学の松岡准教授のご協力の下に、セルラーゼの基質となる蛍光付セルロースを合成する準備に取り掛かった。松岡准教授はすでにグルコースが $\alpha$ -グリコシド結合したアミロースの蛍光付基質を合成することに成功しており、これにより図5のようなFRET (Fluorescence resonance energy transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動)法による基質分解測定に成

功している。今回、セルラーゼとして2糖を認識するセロビアーゼであるためグルコースがβ-グリコシド結合したものであることに加え、蛍光分子をどのように基質に連結するかということに関し、船津グループと共同で検討を進めている。

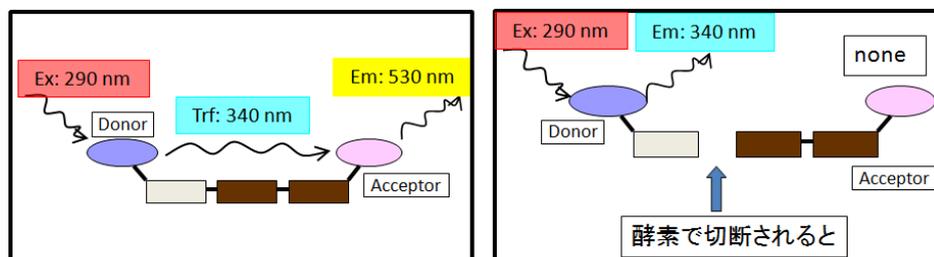


図5 FRET を基盤としたセルラーゼ用基質のイメージ

船津グループ

(1) 研究題目 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

(2) 研究の目的

マイクロアクター、ナノアクターのアレイのそれぞれに1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う。

### (3) 本年度の研究実施内容

#### 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約 100 nm の穴(ナノ開口)が多数開いた金属薄膜を蒸着し、これに光を照射させることにより穴の底部に局在化したエバネッセント場を発生させた(図6)。ナノ開口の形状を種々検討し蛍光信号の強度を比較した結果、穴の部分のガラスを 60 nm エッチングするとエッチングしない場合に比べて蛍光強度が約4倍に増大することが解った。この最適化した形状のナノ開口を用いて、 $\mu\text{M}$  の濃度の蛍光色素が溶液中に浮遊する条件でも穴の底部に固定した1分子の蛍光シグナルを高感度に検出できるようになった。このナノ開口基板に GroES を固定し GroEL を溶液中に漂わせて GroEL と GroES の反応サイクルを1分子でイメージングすることに成功した<sup>4)</sup>。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。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。

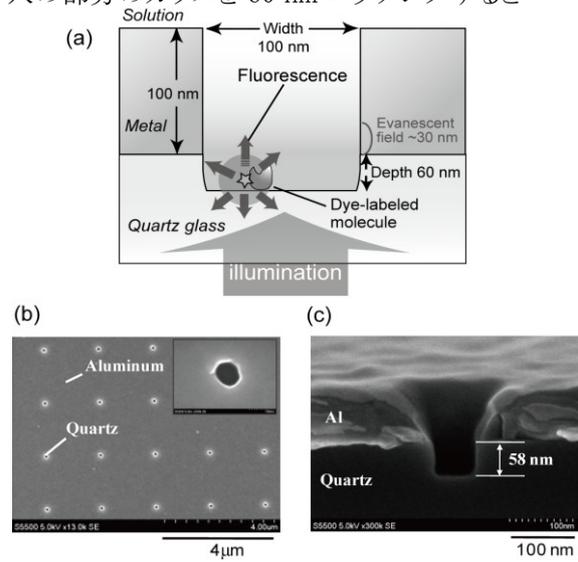
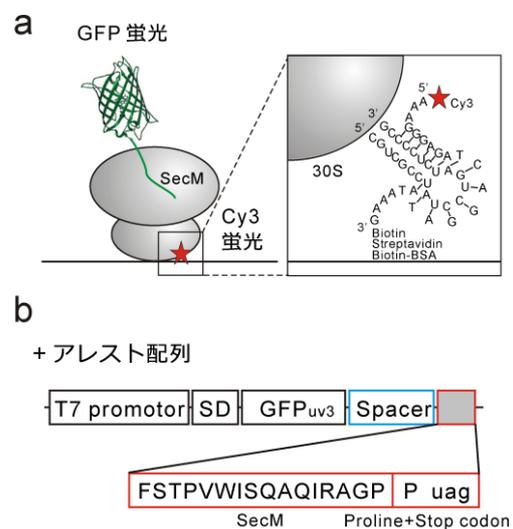


図6 ナノ開口による1分子イメージング (a) 原理図 (b) 基板の上部から見た図 (c) 基板の側面図

## 2. 基板に固定したリボソームによるタンパク質合成の1分子蛍光イメージング

リボソームは mRNA 上のコドンに対応したアミノアシル tRNA を結合し続けることによりタンパク質の合成を行う。この翻訳は正確であり、誤りは約 3000 アミノ酸に1回の確率である。複雑な構造をもつリボソームは、どのようにして正確にタンパク質を合成しているのだろうか？この生命現象の重要な謎に答えるため、リボソームによってタンパク質が合成される様子を1分子蛍光イメージング法にて観察する方法を確立した。リボソームをガラス基板に固定するため、30S 内 16S rRNA のヘリックス44 部位に 23 塩基の付加配列を遺伝子工学的に導入した。ガラス基板はビオチン化した BSA をコートしておき、相補的な配列を持つビオチン化、Cy3 化したオリゴ RNA を、ストレプトアビジンを用いて固定した(図7a)。GFP と SecM アレスト配列をコードする mRNA を加え、完全無細胞翻訳系 (PUREsystem) を用いてタンパク質の合成を行った(図7b)。合成されたタンパク質が SecM アレスト配列のためリボソームから解離できず安定な複合体を形成していることを、GFP の蛍光とオリゴ RNA の Cy3 の蛍光の位置が一致することで確認した。この方法を用いて翻訳の初期過程、伸長過程、翻訳と同時に起こるタンパク質の折りたたみ過程を1分子解析することが可能になった。



## 3. GFP 蛍光団の形成速度の測定法の開発

有用な GFP であるための性質として、蛍光団が効率よく形成される必要がある。この蛍光団形成速度を簡易かつ再現性良く定量する方法を開発した。GFP の DNA を酸素がない条件で無細胞転写翻訳系である PURExpress に加え 37°C で 15 分間合成した。溶液中の酸素を除くため、25 mM Glucose、0.5 unit Glucose oxidase、0.5 unit Catalase を使用した。合成された GFP を含む溶液を、酸素を含む 120 倍量の溶液に希釈し蛍光団の形成に伴う GFP の蛍光を測定した。その結果、GFP UV5 (GFP に以下の変異を入れたもの F99S/M153T/V163A/F64L/S65T/S208L/I167T) の時定数が 10 分と最短であることが分かった。

図7 基板固定リボソームによる GFP 翻訳の1分子蛍光イメージング (a)、リボソームの基板固定法の模式図 (b)、プラスミド DNA のデザイン

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. 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*, 92(4), pp.35-41 (2009). doi: 10.1002/ecj.10056
2. T.Ono, T. Akagi and T. Ichiki, Hydrophilization of amorphous perfluoropolymer using low-pressure argon plasma, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 22(5), pp. 683-689 (2009). doi: 10.2494/photopolymer.22.683
3. J. Yamaguchi, M. Naimuddin, M. Biyani, T. Sasaki, M. Machida, T. Kubo, T. Funatsu, Y. Husimi, and N. Nemoto, cDNA display: A novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res.*37: e108 (2009) doi:10.1093/nar/gkp514
4. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, T. Funatsu, Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex, *Biochem. J.* in press

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)