

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. 研究実施体制

(1)「一木」グループ

- ① 研究代表者:一木 隆範 (東京大学大学院工学系、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. 小規模ライブラリーをモデルとする進化サイクル実証試験

(2)「根本」グループ

- ① 主たる共同研究者: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. 酵素アッセイのための分子設計・予備的検討

(3)「船津」グループ

- ① 主たる共同研究者:船津 高志 (東京大学大学院薬学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 1. 基板に固定して無細胞合成した GFP の蛍光特性の1分子イメージング
 2. セルラーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

一木グループ

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

本研究課題で開発するチップ 1 枚に搭載される分子種は 10^8 個を超えるため、既存のマイクロアレイリーダーやピペット操作などのツールでは対応できない。そこで、新たにチップ上の分子解析、分子操作を可能にするための技術、装置の開発を行った。前者では、TDI(Time delay integration)読み出し型の背面照射型 EMCCD を検出器のライン読み出しとチップの物理的移動速度を同期させて、蛍光イメージを取得する顕微蛍光画像スキャナー装置を試作し、60mm 角チップを約 5 分で全域スキャンし、蛍光画像を取得できることを確認した。後者では、レーザー光を用いてチップ上の分子を選択的に回収する技術を開発した。具体的には、ニトロベンジルを含む光開裂部位を付与した光開裂型の SAM リンカーならびに光開裂型のピューロマイシンリンカー(根本Gと一木Gの共同)を合成した。このリンカーで修飾した基板の上にマイクロインタリオプリント法により mRNA をパターン固定した。この mRNA を逆転写による cDNA 合成で安定化した後、375nm レーザー照射実験を行い、選択的なリンカーの光開裂と核酸の回収が可能であることを確認した。

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

BEAMing 法と自己整合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 DNA ライブラリーをアレイ状に集積したチップの作製を達成している。23 年度は、ビーズの配列工程の自動化による再現性向上を目的として、磁気ビーズ配列装置を設計・試作した。さらに、当該装置と微小な $1\mu\text{m}$ 径のビーズを用いて、1 億個超の大規模 DNA ビーズアレイの作製が可能であることを実証した。従来のマイクロスポッティング法で配置可能な DNA ライブラリー数が $10^3\sim 10^4$ であるのに対し、本課題で開発した技術は $10^8\sim 10^9$ に及ぶ大規模集積化を可能にし、進化分子工学が対象とする大規模変異体ライブラリーをチップ上に実装するための重要な基盤技術である。さらに、マイクロインタリオプリンティング法を用いて DNA ビーズアレイから無細胞転写系により合成した mRNA をパターンニングする技術を開発した[1]。基板への mRNA 分子の固定に自己組織化オリゴヌクレオチドリンカーを用い、ハイブリダイゼーションによるリンカーへの結合の開始をプリント時の温度昇降により制御した場合、直径 $1\mu\text{m}$ の微細なアレイパターンも高コントラストで形成できることが確認された。さらに、この mRNA マイクロアレイチップに対し、逆転写酵素を作用させることで cDNA マイクロアレイに変換できることも確認した。昨年度に達成したプロテインマイクロアレイへの変換技術も併せると、マイクロアレイチップというプラットフォーム上で、細胞内の分子合成と情報の流れを再現可能であることが示された。

3. 小規模ライブラリーをモデルとする進化サイクル実証試験

チップ上に集積したマイクロリアクター内で変異体 DNA から変異タンパク質を無細胞合成し、ライブラリー中から選別したタンパク質の遺伝子情報を回収して、次世代のライブラリーを作製する工程を繰り返し、チップ上で高効率に分子進化を行う方法論の実現性を小規模の変異体 GFP ライブラリーを用いて検証した。具体的には、GFPuv4 の発色団の一部である 65 番目のアミノ酸(スレオニン)のコドンランダム塩基配列で置換した変異体 DNA をライブラリーのモデルとして用いた。この DNA を 1 分子種ずつ増幅、固定した DNA ビーズアレイチップを作製した後、チップ上の各リアクター内で独立に無細胞合成を行い、発蛍光性に大きなばらつきのある第 1 世代変異体 GFP ライブラリーを合成した。その後、強い蛍光を発したリアクター中の遺伝子情報である DNA 担体ビーズをマニピレーターで選択的に回収し、ビーズごと PCR 増幅を行い、第 2 世代ライブラリー作製の DNA を得た。上記と同様の工程を繰り返し、第 2 世代の GFP ライブラリーをマイクロアレイチップ上で発現させると全てのアレイ位置で強い蛍光が検出され、高輝度 GFP のみが選択的に増幅されたことが分かった(図 1)。以上により、チップ上での人為的淘汰の実現可能性を示した。

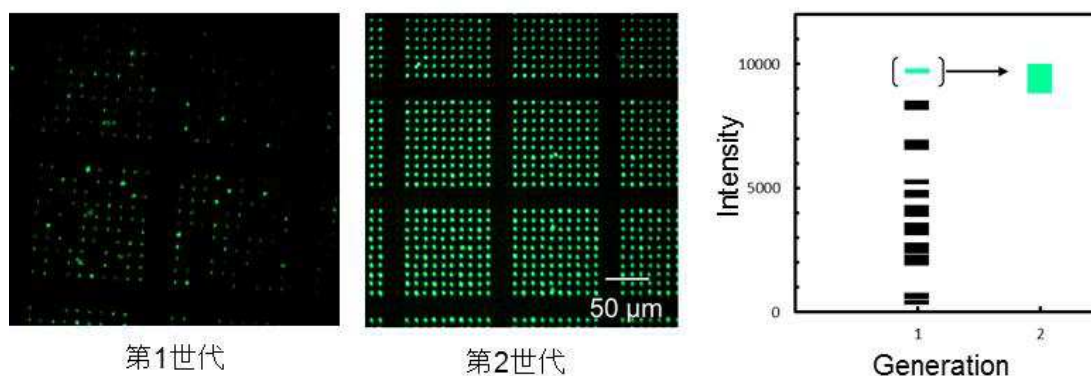


図 1 マイクロアレイチップフォーマット上での人工淘汰実験.

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

一つのウェル内で簡易に cDNA display 法をハイスループット化する方法を開発し論文にまとめた[6]。また、マイクロアレイリアクターに向けた実用的なリンカーとして、回収に必要な光切断及びビオチン・アビジン以外の固定化(金基板にチオール基により結合)を検討した。特に、リボソームや酵素との立体障害や光学特性を考慮し基板とライゲーション連結部位を自由に調整できるようなリンカーデザインを考案した(図 2)。(特願 2011-242790)

2. セルラーゼの分子進化モデルの構築

無細胞翻訳系を用いた酵素進化実験系、特に cDNA display 法を用いた例は世界的に例がないため、モデルとしてサブチリン酵素の試験管内進化実験系の確立を目指した。チップ上での

酵素進化の前段階として酵素進化系における cDNA display 法固有の課題の発掘のため液相系での酵素進化用リンカーを開発した(特願 2011-177076)。本リンカーはその一部に基質が導入されており、酵素により切断されることで cDNA が自発的に回収される。これを用いたサブチリシン酵素のモデル選択実験に成功した。今後、再現性を検討するとともに新規サブチリシン酵素の取得に向けた実験を行う。

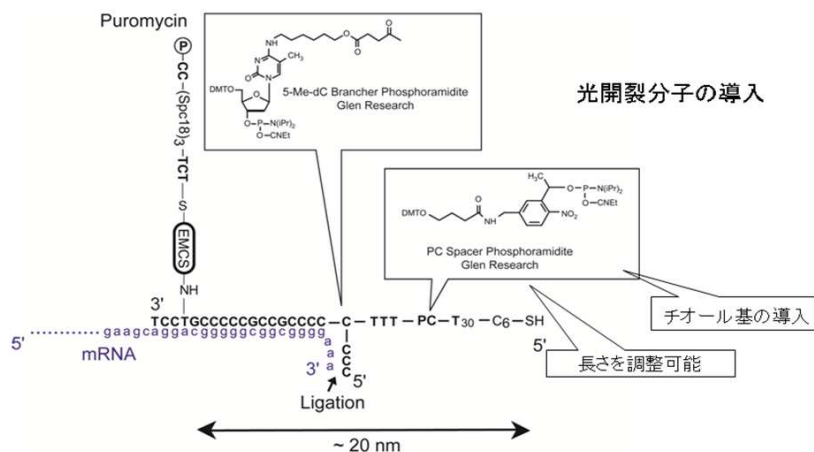


図2 マイクロリアクター用リンカー。

船津グループ

1. 基板に固定して無細胞合成した GFP の蛍光特性の1分子イメージング

高速酵素分子進化システムを作り上げる段階でのマイルストーンとして、GFP をモデルとした分子進化実験の実証を行った。このために、1分子イメージングによる GFP のスクリーニング法を確立した。GFP の特性として、蛍光強度、蛍光スペクトル、発色団の形成速度に注目した。GFP の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することが一般に行われているが、全ての GFP が蛍光を発する状態にあるとは限らない。実際、膜タンパク質との融合タンパク質として発現させた GFP では80%しか蛍光を発しないことが知られている。従って、GFP の変異体の蛍光強度を比較する場合は1分子イメージングして定量する必要がある。1分子の GFP をイメージングすることにより、変異 GFP の蛍光強度を蛍光性の分子の割合を気にすることなく比較可能になった。また、GFP を遺伝子発現のマーカーとして用いる場合、GFP が合成されてから蛍光を発するようになるまでに脱水と酸化が必要であり、これに数分以上を要することが問題となっている。そのため、早く成熟して蛍光性になる GFP の開発が求められている。無細胞タンパク質合成系を用いて GFP を酸素濃度が低い状態で合成し、その後で酸素濃度を上げて蛍光性になるのに必要な時間を測定することに、1分子および多分子の系で成功した[2]。野生型 GFP が蛍光性を示すまでに要した時間が 53 分であるのに対し、調べた変異体の中で最も速かったのは GFPm(S65G, S72A, F99S, M153T, V163A) の 5.6 分だった。このように、GFP の蛍光強度、蛍光スペクトル、発色団の形成速度に関して1分子イメージングで迅速にアッセイできることを実証した。

2. セルラーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発

本研究開発の目標の1つは、分子進化リアクターを用いて高機能の β -グルコシダーゼを得ることである。この達成に向けて、白色木材腐朽菌由来 β -グルコシダーゼを用い、(1)マイクロチャンバーアレイならびに(2)ナノ開口基板を用いた1分子酵素活性測定法の開発を行ってきた。前者においては、白色木材腐朽菌由来 β -グルコシダーゼ(BGL1B)を大腸菌で組換え発現し、精製したものを体積が50 fL(直径:4 μ m、深さ:4 μ m)のマイクロチャンバーアレイチップ上に各リアクターあたり最大1分子になるように希釈封入し、TokyoGreen β -Gluの分解反応

を蛍光顕微鏡下で観察した。各チャンバーの蛍光強度の1分間あたりの上昇率のヒストグラムをとると、図3に示すようにその分布は明らかに量子化されており、0個、1個の β -グルコシダーゼ分子を含むチャンバーに由来するピークが確認された。ここで、0個の場合の分解はTokyoGreen β -Gluの自発的な分解が起こることを示している。またこの測定に要した時間は、1時間程度であった。以上より、迅速かつ定量的に β -グルコシダーゼ1分子の酵素活性を計測可能であることが、実験的に証明された。今後、無細胞タンパク質合成系を用いて合成した β -グルコシダーゼを用いて、同様の実験を行う。ナノ開口基板を用いる1分子アッセイにおいては、昨年度までに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。課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[4]。さらに、金属製ナノ開口チップの他に、ポリマー製ナノ開口チップの作製法も開発した[6]。また、1分子イメージングの準備として、好熱菌のシャペロニンのATP結合に伴う構造変化を捉えることに成功した[5]。さらに、蛍光標識した1分子を分離回収する技術も開発した[3]。一方、 β -グルコシダーゼは、基質の非還元性末端の構造を厳密に認識するのに対し、還元性末端の構造に対する認識が甘い。そこで有機化学的に、セロビオースの還元性末端を伸長し、蛍光アッセイ用基質であるTMR-セロビオースを調製した。このTMR-セロビオースは、セロビオースと同様の速度で β -グルコシダーゼにより加水分解することが確認できたため、今後、Cy5標識 β -グルコシダーゼによるTMR-セロビオースのターナーオーバーのFRET計測をナノ開口基板上で計測する予定である。

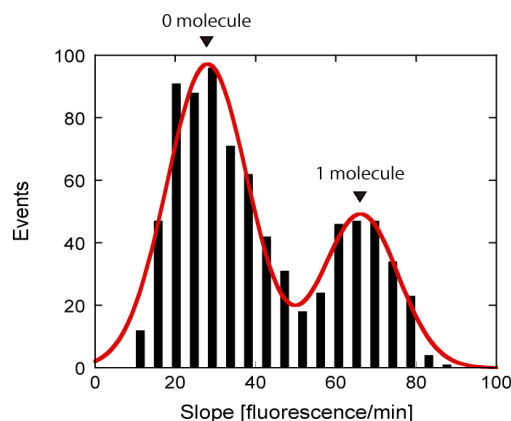


図3 β -グルコシダーゼ1分子の酵素活性。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, "Microintaglio Printing of Biomolecules and Its Application to In situ Production of Messenger Ribonucleic Acid Display Microarray", *Appl. Phys. Express*, vol. 4, p.047001, 2011. (DOI:10.1143/APEX. 4.047001).
2. Ryo Iizuka, Mai Yamagishi-Shirasaki, and Takashi Funatsu, "Kinetic Study of De Novo Chromophore Maturation of Fluorescent Proteins", *Analytical Biochemistry*, vol. 414, No.2, pp. 173-178, 2011 (DOI: 10.1016/j.ab.2011.03.036).
3. Mai Haneoka, Yoshitaka Shirasaki, Hirokazu Sugino, Tokihiko Aoki, Takahiro Arakawa, Kazuto Ozaki, Dong Hyun Yoon, Noriyuki Ishii, Ryo Iizuka, Shuichi Shoji, and Takashi Funatsu, "Microfluidic Active Sorting of DNA Molecules Labeled with Single Quantum Dots Using Flow Switching by a Hydrogel Sol-Gel Transition", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 159, vol. 1, pp. 314-320, 2011 (DOI: 10.1016/ j.snb.2011.06.043).
4. Junichi Wada, Shou Ryu, Yuji Asano, Taro Ueno, Takashi Funatsu, Takao Yukawa, Jun Mizuno, and Takashi Tanii, "Fabrication of Zero-Mode Waveguide by Ultraviolet Nanoimprint Lithography Lift-Off Process", *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 50, 06GK07, 2011 (DOI: 10.1143/JJAP.50.06GK07).
5. Ryo Iizuka, Taro Ueno, Nobuhiro Morone, and Takashi Funatsu, "Single-Molecule Fluorescence Polarization Study of Conformational Change in Archaeal Group II Chaperon", *PloS One*, vol. 6, No. 7, e22253, 2011 (DOI: 10.1371/journal.pone.0022253).
6. Yuki Mochizuki , Manish Biyani , Sachika Tsuji-Ueno , Miho Suzuki , Koichi Nishigaki, Yuzuru Husimi and Naoto Nemoto, "One-pot preparation of mRNA/cDNA display by a novel and versatile puromycin-linker DNA ", *ACS Comb. Sci.*, vol. 13, No. 5, pp. 478-485, 2011 (DOI: 10.1021/co2000295).
7. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, "Damage-free Fabrication of Perfluoropolymer Microaperture Array Device for Single-molecule Imaging", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, vol. 36, pp.553-556, 2011.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 5 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 11 件)