

「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

H24 年度 実績報告
----------------

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. 蛍光アッセイに基づく自動淘汰システムの開発
  2. cDNA ディスプレイマイクロアレイチップ作製技術の開発
  3. アレイチップ上での分子進化の実証実験の実施

### (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 ディスプレイ技術に必須なリンカーのデザイン・試作
  2. 酵素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. マイクロチャンバーを用いたセルラーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発
  2. ナノ開口を用いたセルラーゼ活性の1分子イメージング法の開発

## §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. 蛍光アッセイに基づく自動淘汰システムの開発

大規模マイクロアレイチップの高速イメージング技術を昨年度までに開発したが、その技術により取得した大規模画像データから、酵素活性を示す輝点・輝度を自動的に検出・定量し、その輝度分布および位置情報を出力する解析ソフトウェアを開発した。さらに、出力された位置情報と、解析装置に組み込まれた電動ステージとを連動させることで、DNA回収用のガラスキャピラリーの先端、もしくは光照射によるDNA回収時の紫外線の照射位置に、高活性を示す酵素のDNAを自動的に移動させるシステムも構築した。今後も蛍光アッセイに基づく自動淘汰システムの開発を進め、本システムを用いて実際に分子進化の実証実験を行う予定である。

### 2. cDNA ディスプレイマイクロアレイチップ作製技術の開発

チップ上でcDNA ディスプレイを行い、高活性を示す酵素のDNAを光照射により選択的に回収するために、昨年度より進めている光開裂分子であるニトロベンジルを挿入したピューロマイシンリンカーの開発を根本グループと共同で進め、その有用性を確認した<sup>1)</sup>。さらに、光照射によって連結を行う新たなリンカーを開発し、固相上へのタンパク質の固定化を直接検出することに成功した。酵素(リガーゼ)の代わりに光照射を連結反応に用いることから、連結反応の高度な制御が可能となった。本リンカーは光照射による開裂機能も有しており、従来通り光照射によるDNAの回収が可能である。今後もこの技術の有用性検証を進める。

### 3. アレイチップ上での分子進化の実証実験の実施

マイクロリアクターアレイを用いた淘汰サイクルは既の実証しているが、その工程は手作業を多く含み、信頼性に課題があった。そこで、マイクロリアクターアレイへのDNA固定化磁気ビーズの配置、および無細胞転写翻訳系の封入作業を自動化する流体デバイスを開発し、作業効率、条件制御および再現性の向上を図った。また、昨年度まではGFP(緑色蛍光タンパク質)を用いて実証実験を行ってきたが、酵素分子を対象とした実証実験の準備として、 $\beta$ -グルコシダーゼの遺伝子を磁気ビーズ上に固定化し、発蛍光性基質(Resorufin- $\beta$ -D-glucoopyranoside)を含有した無細胞翻訳系中でその遺伝子から $\beta$ -グルコシダーゼを発現させ、その活性を測定する実験を行い、良好な結果を得た。すなわち、マイクロリアクターアレイに封入した無細胞翻訳系中で酵素アッセイが原理的に可能であることを確認した。今後は、これらの準備状況を踏まえて、GFPと $\beta$ -グルコシダーゼを用いてアレイチップ上での分子進化の実証実験を行う。

根本グループ

酵素の分子進化モデルの構築

cDNA ディスプレイにより提示されたセルラーゼ等の酵素が実際に活性を持つ cDNA ディスプレイ調製法を確立した。具体的には、代表的な産業用プロテアーゼであるサブチリシンの mRNA とピューロマイシンリンカーを連結し、無細胞翻訳系による翻訳後、逆転写して cDNA display 分子としてサブチリシンを提示した。その cDNA display 分子をピューロマイシンリンカー上のビオチンを介して、ストレプトアビジン磁気ビーズ上に固定化し、磁気ビーズ上に固定化されたサブチリシンの活性を蛍光基質により測定した。この活性測定に至るまでの調製操作について最適化を行った。cDNA ディスプレイを用いた酵素進化リアクターではこのように C 末端を固相に固定化された状態の酵素を用いてスクリーニングを行うため、この形態で酵素活性を持つことを確認することが重要な課題であった。今回、バックグラウンドに比べ有意な酵素活性を確認することができたため、酵素進化リアクターを実施するうえで確認すべき項目の一つが実証されたことになる。また、分子進化モデル実験を行うための準備として、より汎用性の高いピューロマイシンリンカーの開発も行った<sup>2)</sup>。今後、今年度に構築した調製法を基にして、サブチリシンの分子進化モデル実験を行う予定である。

#### 船津グループ

##### 1. マイクロチャンバーを用いたセルラーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発

大腸菌を用いて多量に可溶タンパク質として発現でき、さらに精製が容易な $\beta$ -グルコシダーゼ変異体(BGL1 $\Delta$ C63)を作製した。具体的には野生型 BGL1B の C 末端側 63 残基を欠失し、C 末端に His タグを付与した変異体を作製した。精製した BGL1 $\Delta$ C63 が野生型と同様の酵素活性があることを確認した。次に、BGL1 $\Delta$ C63 の酵素活性を1分子レベルで高感度に測定する条件を検討した。検討の結果、BGL1 $\Delta$ C63 を、体積が 50 fL(直径: 4  $\mu$ m、深さ: 4  $\mu$ m)のガラス製のマイクロチャンバーに最大1分子が入るように希釈し、分解されると蛍光を発する基質である Resorufin- $\beta$ -D-glucopyranoside とともに封入することで、BGL1 $\Delta$ C63 の酵素活性を1分子レベルで測定することに成功した。この技術は、一木グループが行う $\beta$ -グルコシダーゼの1次スクリーニングに応用可能である。なお、 $\beta$ -グルコシダーゼの活性を多分子系でオンチップ LC を使って高速、高感度に測定する手法の開発も並行して行った<sup>3)</sup>。

##### 2. ナノ開口を用いたセルラーゼ活性の1分子イメージング法の開発

分子進化させた $\beta$ -グルコシダーゼの性質をより詳細に理解するためには $\beta$ -グルコシダーゼによる酵素反応のターンオーバーを1分子レベルで解析することが望ましい。これを行うために、根本グループが合成した Tetramethylrhodamine-cellobiose を蛍光性基質として使い、 $\beta$ -グルコシダーゼとの結合と解離の様子をナノ開口を用いて1分子イメージングした。BGL1 $\Delta$ C63 をガラス基板に固定するため C 末端に Avi タグ付与した変異体を作製しビオチン化した。これをストレプトアビジンの吸着したガラスに固定した。試料の準備と並行して、1分子蛍光イメージングの準備を行った<sup>4)</sup>。 $\beta$ -グルコシダーゼをナノ開口のガラス部に固定し、溶液に 1  $\mu$ M の Tetramethylrhodamine-cellobiose を加えたところ、ナノ開口部で蛍光の明滅として $\beta$ -グルコシ

ダーゼとセルビオースの結合解離が観察された。結合時間は平均 28 ms の指数分布となった。この技術を利用してセルロースによる $\beta$ -グルコシダーゼ活性の阻害などが定量できると期待される。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Shingo Ueno, Aiko Ono, Ryo Kobayashi, Yoko Tanaka, Shusuke Sato, Manish Biyani, Naoto Nemoto, Takanori Ichiki, “Photoassisted recovery of DNA molecules for on-chip directed evolution”, *J. Photopolymer Sci. Technol.*, vol. 25, pp. 67-72, 2012 (DOI: 10.2494/photopolymer.25.67)
2. Shingo Ueno, Shinnosuke Kimura, Takanori Ichiki, Naoto Nemoto, “Improvement of a puromycin-linker to extend the selection target varieties in cDNA display method”, *J. Biotechnol.*, vol. 162, pp. 299-302 , 2012 (DOI: 10.1016/ j.jbiotec. 2012.09.003)
3. Yanting Song, Masao Noguchi, Katsuya Takatsuki, Tetsushi Sekiguchi, Jun Mizuno, Takashi Funatsu, Shuichi Shoji, and Makoto Tsunoda. “Integration of pillar array columns into a gradient elution system for pressure-driven liquid chromatography”, *Anal. Chem.* vol. 84, No. 11, pp. 4739-4745, 2012 (DOI: 10.1021/ ac3001836)
4. Yodai Takei, Ryo Iizuka, Taro Ueno, and Takashi Funatsu. “Single-molecule observation of protein folding in symmetric GroEL-(GroES)<sub>2</sub> complexes”, *J. Biol. Chem.* vol. 287, pp. 41118-41125, 2012 (DOI: 10.1074/jbc.M112.398628)
5. Subhashini Raj Kumal, Manish Biyani, Shingo Ueno, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Simultaneous synthesis and biotinylation of proteins using puromycin-based labeling technology for fabrication of protein array chip”, *Jpn. J. Appl. Phys.* (in press).
6. Shusuke Sato, Manish Biyani, Takanori Akagi and Takanori Ichiki “Artificial darwinian selection technology on microarray chips towards directed evolution using single molecule processing” 16<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized

Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2012), pp. 124-126, 2012

7. Yoko Tanaka, Manish Biyani, Takanori Akagi, Takanori Ichiki “High-throughput protein microarrays: feature size effects on printing arrays with in situ protein synthesis” 16<sup>th</sup> International Conference on Minituarized System for Chemistry and Life Sciences (Micro Total Analysis Systems 2012), pp. 1297-1299, 2012
8. Shingo Ueno, Aiko Ono, Ryo Kobayashi, Yoko Tanaka, Shusuke Sato, Manish Biyani, Naoto Nemoto, Takanori Ichiki “Spot-selective DNA recovery from DNA microarray chips for on-chip directed evolution” 16<sup>th</sup> International Conference on Minituarized System for Chemistry and Life Sciences (Micro Total Analysis Systems 2012), pp. 1300-1302, 2012

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 12 件)