

サブテーマ名：A 高速分子進化のための基盤技術の開発

小テーマ名：A3 マイクロリアクターアレイ進化リアクターの開発

フェーズ I <1-e>, <1-d>の一部

【概要】

タンパク質やペプチドは自己複製できないので、それらの進化のためには、自己複製できる核酸分子でできた遺伝子と対応づける必要がある。これを遺伝子型・表現型対応付けの問題という。天然進化でも、進化分子工学でも、この対応付けの方式には、ウイルス型、細胞型、外部知性型の3種がある。ウイルス型は遺伝子型分子と表現型分子を単に結合して対応づける方式であり、例えば、リボソーム上で何らかのリンカーを介して新生蛋白にmRNAを結合させればよい（これを *in vitro virus* (IVV) 法または mRNA 提示法という）。細胞型は遺伝子型分子と表現型分子を一つのコンパートメントに囲う方式である。ウイルス型対応付け技術は単一の機能を進化させることに適しており、現在のところ、タンパク質の親和性を高めるケースがほとんどである。これに対し、細胞型の対応付け技術はコンパートメント内システム全体の最適化に適しており、有用酵素の触媒機能を最適化することに好都合である。本研究では従来技術のような生細胞を用いずに人工的なコンパートメント化を達成し、単一タンパク質を進化させる上で有利な *in vitro virus* (IVV) 法を組み合わせることで *in vitro* で酵素の高速進化を行うハイスループットシステムを開発した。

【フェーズ I の研究成果】：

大規模並列処理を可能にする IVV を用いた細胞型進化リアクターシステムの構築を図り、マイクロ流体デバイスを用いて、マイクロリアクターアレイ上に IVV 分子を固定化した微粒子を配列操作するための基盤技術を研究し、エバネッセント光を用いた1分子計測技術との組み合わせにより単一生体分子の大規模並列計測を行うシステムを開発することを目指した（図1）。アルデヒド還元酵素の耐熱化を具体例として、このプロセスの例証を試みた。フェーズ I の成果は、

① 磁性薄膜を付与したマイクロリアクターアレイチップを用いて、100万個の磁気ビーズを自己整合により個々のリアクター内に短時間で配置する技術を開発し、充填率99%以上を達成した。

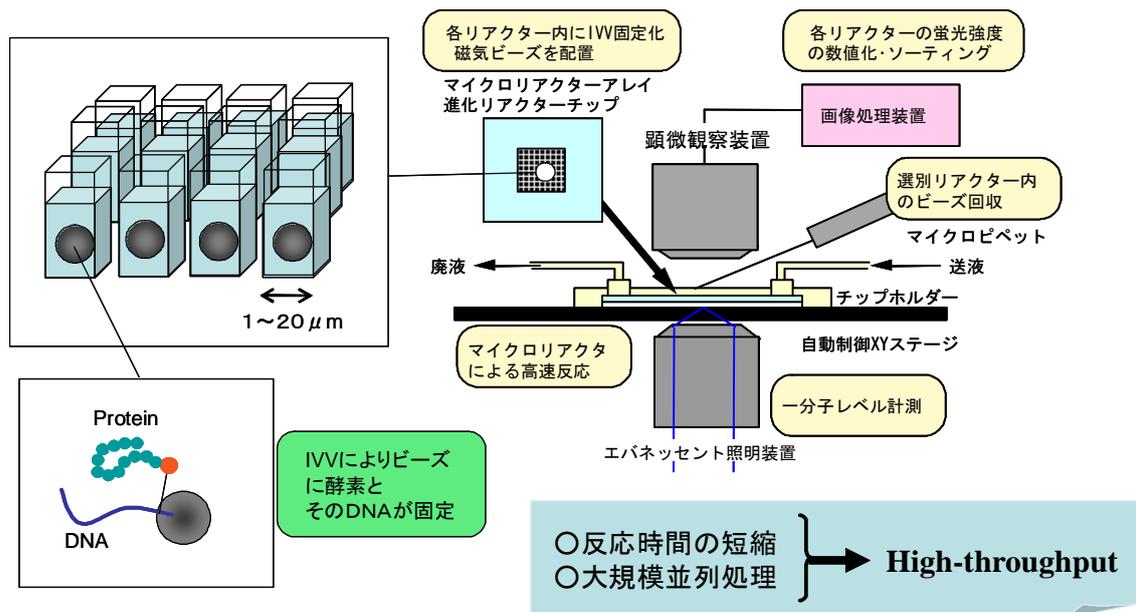


図1 マイクロリアクター型進化リアクターシステムの概略図

② IVV を用いて mRNA を磁気ビーズ上に固定し、無細胞翻訳系を使いビーズ上で合成したタンパク質（アルデヒド還元酵素）をそのままビーズ上に固定化する方法を確立した。また、このように固定化した酵素が活性を持つことも確認した。

[フェーズⅡの研究成果]：

フェーズⅠで提案した磁気ビーズを用いたリアクターアレイは、1 分子検出が光学系等の改良によっても原理的に難しいことから、新たにチップ上に直接酵素などのタンパク質を固定したマイクロリアクターアレイとその作製法を考案した。

リアクターアレイ内の酵素アッセイに関しては高効率酵素スクリーニングシステムの実現に向けてマイクロリアクターチップ技術と高感度顕微イメージング技術を基盤とする自動計測システムの開発を進め、図2～5にあるようにその測定条件を検討した。その結果、①高感度化については、リアクターのサイズ（アスペクト比）や蛍光性基質等の利用により、1 分子レベルの計測も可能であることを確認した。②多点並列計測については、10,000 個レベルのマイクロリアクターを集積化したチップでは、機械的な精密アライメントによりリアクターの位置精度を確保することが可能であり、1,000,000 個レベルにまで拡張した場合にも精密アライメント機構にソフトウェアによる補正を加えることで十分対応可能と考えられる。③迅速計測については、現在、100 個のリアクターの計測に1～2 秒を要する。したがって、10,000 個レベルの計測であれば、2～3 分程度のインターバルで全リアクターのカイネティック計測が可能である。

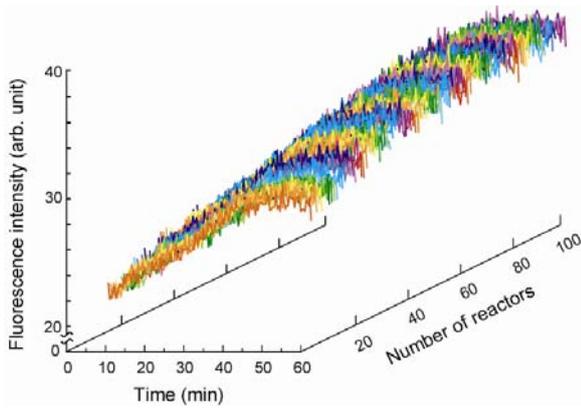


図2 並列カイネティック計測.

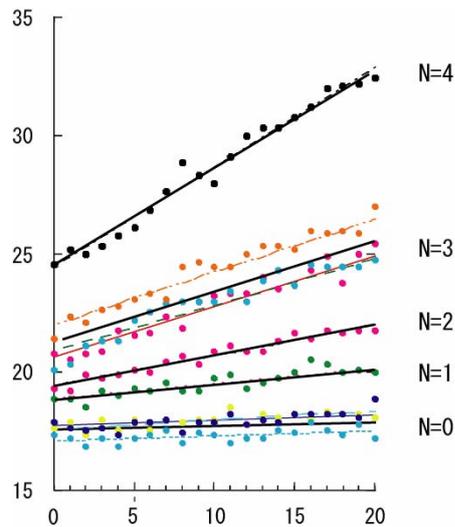


図3 1分子レベル酵素アッセイ.

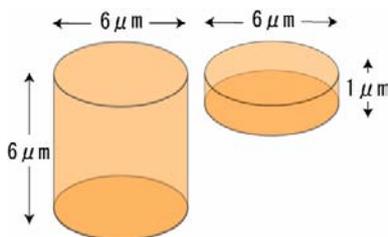


図4 検出感度に及ぼす形状の影響を調べるために試作したマイクロリアクターの寸法

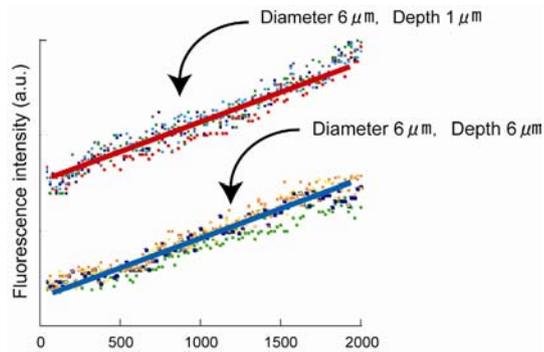


図5 図4に示す形状のリアクターをもつマイクロリアクターアレイチップを用い、各リアクター内に含まれる酵素分子数を等しくした場合のアッセイ結果.

また、タンパク質のチップ上への固定化に関しては、各ウェルに1遺伝子を大量並列的かつ効率的に対応させるために「DNA-Protein チップ」というコンセプトで1分子レベルまで希釈したDNAを各ウェルの中で転写、翻訳を行いIVV技術によって固定化する(図6A)。また1分子PCRによって各ウェルのDNAを適宜増幅させて検出しやすくする方法も考案した。モデル実験として2つの異なる遺伝子を用いて96穴プレートレベルで本コンセプトを実証した(図6B,C,D)。

この他に、プロセスに必須な翻訳過程を効率化するために5'UTRの最適化を行い、従来の翻訳効率の良いグロビンのものより、さらに短い翻訳時間(10分)で2倍以上の効率が良いものが取得された。

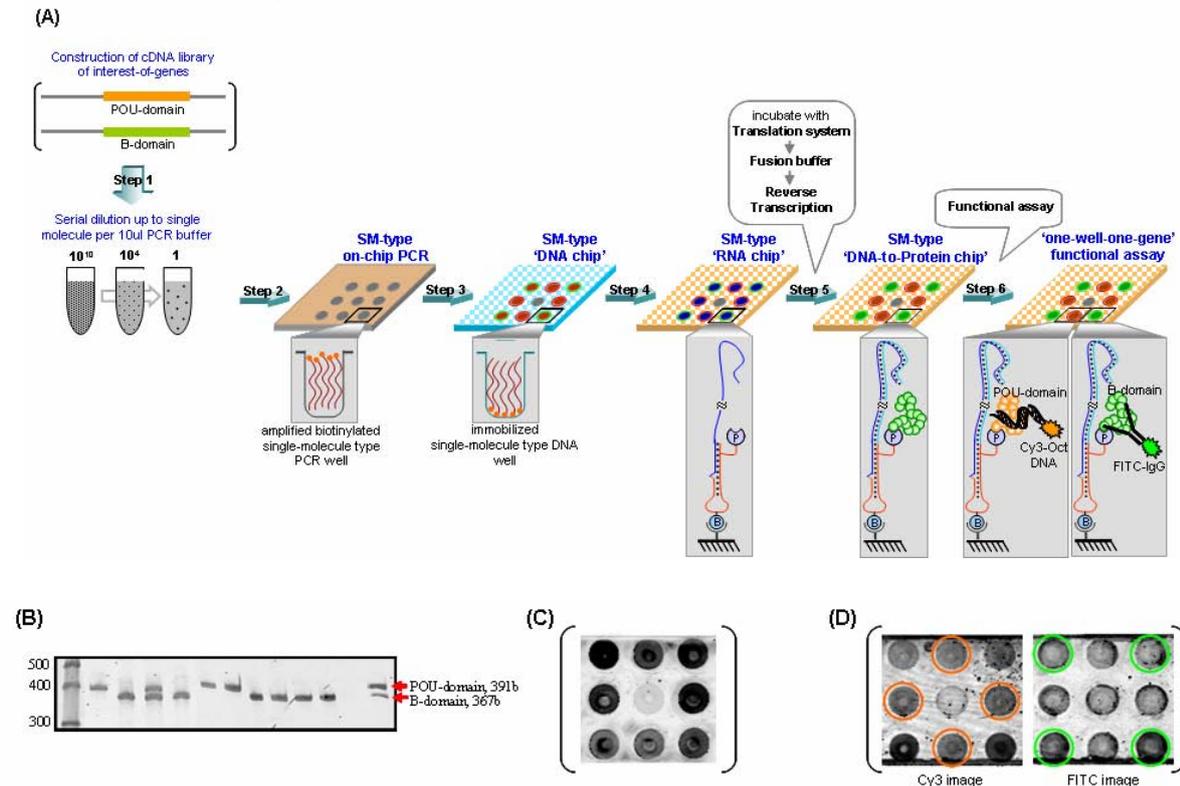


図6. DNA-Protein Chip A) 概念図 生体分子のチップ間移動によってDNAチップからRNAチップ、さらにProteinチップに変換する。(B) PouとB-domainの2種類の遺伝子をコードしたDNAを混合し1分子レベルに希釈したことを確認。(C) B-domainを固定化してある周囲の8つのウェルがFITC-IgGと相互作用している。真ん中のウェルはNegativeコントロール。(D) FITC-IgG(左)とCy5-DNA(右)を加えて観察した図

[今後の展開]:

計測システムの高感度化ならびに大規模化については、研究開始時の目標をほぼ達成していると考え、高効率酵素スクリーニングシステムを実際に1分子レベルで稼働させようとする場合、(1)希釈サンプルの封入作業の再現性に実験者の手技がかなり影響しているが、微小スケールでの現象を再現性よく制御するために、今後、チップの表面処理などによる自己整合的な試料導入、封入法を導入する必要があると考える。(2)現状のシステムでは、チップ前面に励起光を照射し続ける仕様になっているため、長期に亘るカイネティック計測で蛍光分子の褪色が課題となっている。この問題は励起光の照射域を制限する改良により解消されると考える。また、(3)10,000個レベルのライブラリースクリーニングには現状でも対応できるが、今後、1,000,000個レベルのライブラリー計測に拡張することを考えると、全てのリアクターを単純に順次計測するだけで数時間を要することになるため、高輝度リアクターの探索効率を大幅に改善するための探索法に工夫する必要がある。

5年間に亘る研究の成果として、セル型進化リアクター技術に必要な高効率 1 分子酵素アッセイシステムが 10,000 サイズのライブラリー対応ではあるが実現された。一方、マイクロリアクター技術と補完性のよい IVV チップなどのアレイ状分子配置技術も開発してきたため、今後はそれぞれの要素技術を統合し、マイクロアレイ技術、1 分子検出技術、IVV 技術の融合による酵素分子進化技術の達成を目指したい。