

<p>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</p>
<p>サブテーマリーダー：埼玉大学大学院理工学研究科、教授、西垣 功一 (○:小テーマ代表者) 研究従事者：(財) 埼玉県中小企業振興公社、雇用研究員、Manish Biyani (財) 埼玉県中小企業振興公社、 雇用技術員、Madhu Biyani、辻 幸香、鈴木 雅恵、三井 隆広 東京大学大学院工学系研究科、准教授、一木 隆範 ジェナシス(株)、Chief Scientific Officer、○根本 直人 主任研究員 Mohammed Naimuddin、研究員、大滝 真作 ジーンワールド(株) 代表取締役社長、林 伸信 (株) 島津製作所 主任、四方 正光</p>
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要 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。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 <i>in vitro</i> virus (IVV) 法 (mRNA提示法とも言う) を組み合わせることで、<i>in vitro</i>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する。</p> <p>②研究の独自性・新規性 半導体微細加工技術を用いた人工的なコンパートメント作製とそれを応用した磁気ビーズ配列技術及びビーズに固定化したIVVの単一分子操作技術の組み合わせによる大規模並列処理が可能な細胞型進化リアクターシステムは酵素のような機能タンパク質を高速進化させる初めての基本技術である。</p> <p>③研究の目標 (フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に) フェーズⅠ：半導体微細加工技術を高速分子進化に導入し、<i>in vitro</i>細胞型進化リアクターシステムの基本を構築する。また、IVV法による固相(ビーズ)上でのタンパク質合成法を確立する。 フェーズⅡ：より実現可能性のあるリアクターシステムを提案し、モデル実験によって新規分子創成ツールとしての有用性を実証する。 フェーズⅢ：創薬への応用を中心に汎用性の高い高速分子進化リアクターとして展開する。</p> <p>研究の進め方及び進捗状況 (目標と対比して) (1) 半導体微細加工技術を応用して磁気ビーズ配列のためのマイクロリアクターアレイチップを開発した。変調磁場を利用して、100万個レベルの大規模リアクターアレイ内に個々の磁気ビーズを自動的に配列する技術を開発し、99%以上の高い充填率を達成した。 (2) IVVによるスクリーニング法を確立した。 (3) IVVによる固相でのタンパク質合成に成功した。 (4) アルデヒド還元酵素をビーズ上で合成し活性を持つことを確認した。 問題点は、(a) 活性評価の際の背景雑音。 課題として、(b) 反応体積の縮小化によるS/N比の増加 (光学系の開発も含む) (c) 単一磁気ビーズのマニピュレーション (d) 活性評価方法の検討。</p>

(5) 上記の課題を克服すべく、磁性体ビーズを用いず、複数の基板を用いた生体分子のウェル間移動によってDNAチップからプロテインチップを作製する「DNA→プロテインチップ」を考案し、この実証のためのモデル実験を96穴プレートで行った。
 (6) 翻訳の効率化のためのスクリーニング法を考案し、2種類の5' UTRの最適化をおこなった。

主な成果

具体的な成果内容：

- 1) 100万個レベルの大規模マイクロリアクターアレイチップ上に個々の磁気ビーズを自動配列する技術を達成した。
- 2) IVVのスクリーニングを効率化するスペーサーを開発した。
- 3) 固定化mRNAで合成したタンパク質の酵素活性を高める方法を発見した。
- 4) 「DNA→プロテインチップ」を考案しモデル実験で確認した。
- 5) 5' UTRの最適化をおこなった結果、従来の配列より半分の長さで翻訳効率は2倍の配列を見出した。

特許件数：8件 論文数：1件 口頭発表件数：20件

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

マイクロチップ技術の応用による細胞型進化リアクターシステム開発の研究成果は、生体分子の多様な機能の大規模並列評価を世界で初めて実現する技術である。第20回国際生化学・分子生物学会議においてJB OUP Poster Prizeを受賞(2006.6)。M. BiyaniがG. O. T. Summit (Boston) で招待講演(2007.4)

2 実用化に向けた波及効果

マイクロリアクター進化リアクターは、従来の進化分子工学技術では容易でなかった酵素機能などの高速進化を可能にするため、医療、創薬、環境、新エネルギー分野に有用な新規分子の開発を迅速化する有用基盤技術になることが期待される。さらに、現在ポストゲノムで主流を占めるネットワーク解析技術では不可能な、例えば、機能未知タンパク質の機能同定（特に有用酵素）のようなポストゲノムの手段としても応用される可能性がある。

残された課題と対応方針について

マイクロリアクター内反応の高感度検出、自動化：細胞型進化リアクターシステムは1) マイクロリアクターチップ、2) マイクロリアクター内反応の検出装置、及び3) IVV固定化チップとその合成産物のチップ間移動によって構成される。2)、3)の開発が今後の課題であるが、既存の顕微観察装置やチップ表面処理、チップ操作技術等の改良により達成可能と考えられ、このシステムは汎用性の高い高速分子進化リアクターとして期待できる。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	H14	H15	H16	H17	H18	H19	小計	H14	H15	H16	H17	H18	H19	小計	
人件費	64	5,991	6,220	8,154	19,372	7,670	47,471	1,095	10,692	8,820	8,065	7,475	5,356	41,503	88,974
設備費	6,606	5,559	1,472				13,637							0	13,637
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,354	4,933	8,081	11,497	8,546	6,250	40,661	200	3,500	3,500	4,680	7,919	3,750	23,549	64,210
旅費		209	135	305	847	93	1,589				45	122	122	289	1,878
その他		723	518	759	1,395	624	4,019	29,205	699	699	873	873	873	33,222	37,241
小計	8,024	17,415	16,426	20,715	30,160	14,637	107,377	30,500	14,891	13,019	13,663	16,389	10,101	98,563	205,940

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：蛍光イメージャー、高速液体クロマトグラフィー、蛍光偏光プレートリーダー
 地域負担による設備：

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。