

博士論文（要約）

マイクロアレイチップ技術を用いた
高速タンパク質進化システムの創製

佐藤 秀介

論文の内容の要約

論文題目 マイクロアレイチップ技術を用いた高速タンパク質進化システムの創製

氏名 佐藤 秀介

第1章 序論

本論文は、医療、環境、バイオなど幅広い分野で活用されているタンパク質機能の多様性に着目し、食品加工、治療薬・診断薬、バイオセンサー、バイオ燃料製造システムなどの高機能化には、タンパク質機能の飛躍的な向上が本質的な課題でなっている。進化分子工学は、変異と淘汰の繰り返しであるダーウィン進化機構を分子レベルで人為的に再現する技術である。また、無細胞合成システムは、生細胞の世代周期に起因する束縛を考慮せずにタンパク質機能を淘汰可能な技術である。この2つの技術は、機能性タンパク質の高速分子進化が可能な技術として注目されている。しかし、無細胞合成を利用した分子進化においては、アフィニティー以外の触媒や発蛍光機能を高効率にスクリーニングする手法が欠落しているのが現状である。そこで、この課題を克服する有力な戦略として、高集積アレイをプラットフォームとするシステム構築を提案した。本システムの根幹となる大規模集積DNAアレイ技術、大規模集積タンパク質アレイ技術、淘汰技術を開発し、高速分子進化システムの構築を行った。従って、本研究の目的は、アフィニティー以外の機能を有する機能性タンパク質を進化可能なシステムを実現するため、大規模集積アレイをプラットフォームとする高効率スクリーニングシステムを提案し、これを構築することである。

第2章 大規模集積変異DNAビーズマイクロアレイ技術

本章では、タンパク質アレイに変換可能な高集積DNAアレイチップの作製方法を提案し、その有用性の実証を行った。

従来のDNA作製工程では、予め精製したDNAを逐次、機械的にスポットする方法が一般的とされていたため、物理的な制限により、キロ規模($<10^4$)以上のアレイ化が困難である。この課題を克服するため、エマルジョンPCR法を利用した1分子種遺伝子の増幅固定ビーズの作製と外部磁場を援用した自己整合によるランダムアレイ状配置法を連携する手法を提案し、メガ・ギガ規模($>10^6$)の長塩基長DNAを高集積アレイ状配置する技術の開発を行った。

まず、エマルション PCR 法による磁気ビーズ担体表面上への DNA 増幅固定を利用して、1 分子種 DNA の精製を行った。1 分子種エマルション PCR では、水とオイルと界面活性剤の攪拌で形成するエマルションに内包したビーズ数や DNA 分子数を制御する必要がある。これらの要因となるエマルションの粒子数ならびに粒径分布を把握した経験式に基づいて調製条件の最適化を行い、GFP をコードした DNA (1,009 bp) と RFP をコードした DNA (970 bp) を 1 個の磁気ビーズにそれぞれ 1 分子種固定した磁気ビーズ担体を作製した。

次に、自己整合による磁気ビーズのアレイ状配置技術の開発を行った。磁場援用で磁気ビーズの高い充填率を得るための要因を明らかにした。得られた結果から、磁石とチップ表面との距離を 0.1 mm で制御可能な精度が必要なこと、また、チップ上のマイクロウェルの個数に対して、最低 5 倍量以上の磁気ビーズ量が必要なことを示し、必要な磁気ビーズのコストについての知見が得られた。これらの要因を考慮した上で、自動磁気ビーズ配列装置を開発し、実際にこれを用いて、20 min の外部磁場援用で、磁気ビーズを密度 6.9×10^5 ビーズ/cm²、充填率 99.9% で並列配置した 25 メガ規模の高集積変異 DNA ビーズマイクロアレイチップを作製した。

以上のように、従来のスポッターを用いる逐次工程では実質的に不可能であった 25 メガの高集積 DNA マイクロアレイチップの作製が可能であることを実証した。

第 3 章 DNA ビーズマイクロアレイからのプロテインアレイへの一括変換技術

本章では、第 2 章において開発した高集積 DNA ビーズマイクロアレイ技術を基盤とし、DNA ビーズマイクロアレイ上での一括無細胞合成により、高集積タンパク質マイクロアレイチップを得る手法の開発を行った。

従来、タンパク質の精製工程による莫大なコストがアレイチップの作製を困難にしていた。近年、精製タンパク質を必要としないタンパク質マイクロアレイ技術の開発により、研究室レベルでアレイチップの作製が可能となったが、膨大な変異体ライブラリーのハイスループットスクリーニングに課題が残った。そこで、逐次工程に依らない戦略として、溶液のアイソレーションを利用した DNA ビーズからのタンパク質オンチップ合成によるアレイチップ作製を提案し、大規模集積変異 DNA ビーズアレイから変異体タンパク質アレイへの一括変換を行った。

まず、大規模マイクロウェルアレイ上への水溶液のアイソレーションを行った。PDMS マイクロウェルアレイチップ上への無細胞合成液の展開は、作製した送流デバイスを利用して行った。シリコンオイルを送液することでマイクロウェルアレイへの溶液のアイソレーションを行い、蛍光顕微鏡 (Ex.488 nm) により、マイクロウェルアレイの均一な蛍光強度、および、マイクロウェル外への漏洩が無いことを確認した。この結果は、疎水性マイクロウェル内に配置した親水性ビーズが、展開した水溶液の保持体として機能させる方法により、無細胞合成液のアイソレーションに有効であることを示している。

次に、タンパク質のオンチップ無細胞合成を行った。DNA を固定したビーズを配置したマイクロウェルアレイチップ上で、モデルタンパク質として用いた GFP をコムギ胚芽由来無細胞転写翻訳系を利用してオンチップ合成し、488nm 励起による蛍光強度の上昇により、GFP のその

場合成、フォールディングを確認した。これは、フェムトリットルスケールの反応空間でも、タンパク質の合成、フォールディングが妨げられず進行したことを示している。

最後に、GFP 発光団領域の 65 番目アミノ酸のトレオニンのコドンに対して、Expression PCR により変異を導入した変異 DNA ライブラリーを大規模集積変異 DNA ビーズマイクロアレイチップとして作製し、変異体タンパク質のオンチップ無細胞合成を行った。発光団領域に変異を導入したため、オンチップ合成した変異体 GFP アレイには蛍光強度に強弱が生じた。これを既報と比較し、多様性の妥当性が示され、大規模変異体 GFP アレイを作製できた。

以上のように、従来、困難とされたメガ規模の変異体タンパク質ライブラリーのマイクロアレイ化が可能であることが実証された。

第 4 章 マイクロアレイチップをプラットフォームとする人工淘汰技術

本章では、ハイスループットスクリーニングシステムにより、遺伝情報分子の選択的回収と優性種の増幅を行い、マイクロアレイチップをプラットフォームとする変異体ライブラリーの人工淘汰技術の開発を行った。

ダーウィンの自然淘汰による進化機構では、タンパク質機能の多様性をスクリーニングし増幅する淘汰プロセスが不可欠である。そこで、高速顕微蛍光アレイスキャナーと画像解析システム、マイクロマニピレーターで構成されるハイスループットスクリーニングシステムを構築し、機能性に優れるタンパク質の遺伝情報の選択的取得と増幅を行い、マイクロアレイチップをプラットフォームとする変異体 GFP ライブラリーを用いたオンチップ人工淘汰の POC 実験を行った。

まず、蛍光アッセイシステムの開発を行った。TDI ラインセンサ方式背面照射型 EMCCD カメラを搭載した蛍光顕微鏡を使用し、アレイスキャンから画像解析ソフトへ出力することで、蛍光輝度から閾値を超えた機能のアレイ位置の座標情報を自動取得するシステムを構築した。解像度が 25,000 倍、かつ、本研究のアレイチップに対してスキャンスピードが数十分で行える蛍光アッセイシステムを開発した。メガ規模の変異体タンパク質ライブラリーをハイスループットスクリーニング可能なことを示した。

次に、DNA の選択的回収と増幅を行った。ガラスキャピラリーを用いてビーズを回収することで、同時に DNA 分子の回収も可能にする選択的分子回収システムにより、機能情報から遺伝情報への流れを構築した。その上で、GFP に変異を導入した変異体タンパク質ライブラリーをアレイ状配置したチップを作製し、アレイスキャンスクリーニングから最も蛍光輝度の高い GFP をコードした DNA を固定したビーズを回収し、PCR 増幅した DNA から再びタンパク質マイクロアレイ化させることを達成した。この結果により、マイクロアレイチップのプラットフォーム上で人工淘汰のプロセスが実施可能であることを示した。

以上のように、メガ級の大規模変異体ライブラリーの分子機能情報を短時間で取得可能にするハイスループットスクリーニングシステムの開発により、遺伝情報の選択的回収と所望の機能性タンパク質の増幅を行う、マイクロアレイチップをプラットフォームとする人工淘汰が実

施可能なことを示した。

第 5 章 結論

本論文は、アフィニティー以外の分子機能を進化させるため、マイクロアレイをプラットフォームとする分子進化システムを提案し、高集積 DNA ビーズマイクロアレイチップとオンチップ無細胞合成の連携により、25 メガ級の高集積タンパク質マイクロアレイチップの作製が可能であることを示すとともに、高速分子進化の実現の可能性を、小規模変異体 GFP ライブラリーを用いて実証し、新規な分子進化システムを構築したものである。本論文で創出された新しい方法論は、進化分子工学手法の汎用性を拡張する技術であり、今後、有用酵素の取得などに繋がることが期待される。これらの成果は、バイオエンジニアリングの観点から有用性が高く、学術的にも価値が高いと判断される。