

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23655146

研究課題名（和文） マイクロ波照射による無細胞発現系への活性化技術の開発

研究課題名（英文） Development of activation technology for cell-free system under microwave irradiation

研究代表者

吉村 武朗（YOSHIMURA TAKEO）

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教

研究者番号：10580938

研究成果の概要（和文）：宿主に左右されない簡便な蛋白質の大量発現技術は、蛋白質結晶構造解析、医療への応用、バイオ材料開発に不可欠である。無細胞発現系は、将来の発展可能性の高いミクロの蛋白質工場であり、この蛋白質工場の効率を上げ、大幅なスケールアップの達成と安定供給が今後のバイオ工学の未来を担う技術になる。本研究により、オリジナルのマイクロ波加熱装置を作製し、マイクロ波遺伝子増幅反応の促進と、無細胞発現系による GFP の蛍光強度の増加を達成した。

研究成果の概要（英文）：New technology of protein expression is necessary for protein crystal structure, biomaterial and medical science. The cell free protein expression system is expected to lead the future bioengineering. To achieve acceleration of activity of enzymatic reactions, we prepared an original microwave applicator for microliter reaction scale. In this study, expression of GFP protein and DNA polymerization were demonstrated by using resonant cavity type of microwave applicator. As a result, we confirmed the microwave effect to enzymatic reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：グリーンケミストリー

1. 研究開始当初の背景

2010年10月時点で約7万の蛋白質構造が解かれ Protein Data Bank に登録されており、多くの蛋白質構造の詳細が明らかになっているが、現時点でも蛋白質構造と機能の相関はまだ未解明の部分も多く、蛋白質研究の発展が期待される。今後、宿主を問わない蛋白質の大量発現を簡便に得られる手法が確立できれば、蛋白質研究はより進展し、蛋白質結晶構造解析、医療への応用、バイオマテリアルとしての利用が期待できる。

近年、注目される蛋白質合成方法が無細胞発現系である。無細胞発現系は、細胞内（大腸菌、コムギ胚芽、昆虫細胞）の蛋白質翻訳系を抽出した系や再構築した蛋白質合成系である。無細胞発現系には3つのメリットがある。一つは、宿主に毒となるような蛋白質などを問わずすべての蛋白質をターゲットにできる点。二つ目は、反応液内で発現させるため細胞の培養をおこなう必要が無い点。三つ目は、特定配列をつけた目的蛋白質の DNA や RNA を反応液に加えるだけという非常に簡便な操作で蛋白質が得られる点である。

無細胞発現系の効率を上げ、大幅なスケールアップの達成と安定供給が今後のバイオ工学の未来を担う技術になる。我々は、無細胞発現系の超効率化への新技術確立のために、従来の熱伝導によるエネルギーをマイクロ波由来のエネルギーへの転換を提案する。本研究は、グリーンケミストリー12条の1, 2, 6, 9条に合致する。

2010年時点でマイクロ波装置は、化学反応ではJ-SCIENCE LAB社グリーンモチーフ・Ic、四国計測工業μ Reactor Ex、CEM社 Discover、Anton Paar社 Mcirowave 300、Biotage社 Initiatorなどが販売されていたが、反応スケールがすべてmLスケールであった。無細胞発現系はもちろん、高価な試薬を使用する酵素反応系では50~100 μLの微量スケールで反応をおこなうため、上記装置では高精度に加熱をコントロールすることは原理的に不可能である。また、マイクロ波加熱は改良の余地が大きい技術であり、その加熱効果や原理について世界中で研究がおこなわれている状況である。

そこで、微量スケールに特化したマイクロ波加熱装置の作製をサイダ・FDS社に依頼し、我々がこれまで研究してきたマイクロ波遺伝子増幅の反応系 (Microwave Assisted Rolling Circle Amplification) をテストしながら、装置の最適化を図った。この共振空洞型マイクロ波装置完成後、無細胞発現系に対しマイクロ波加熱をおこないその可能性を検証した。

2. 研究の目的

マイクロ波加熱を、有機反応分野のように通常加熱(熱伝導)と異なるマイクロ波反応促進効果を証明し、バイオの分野で有効な活性化技術として確立を目指す。

- (1) 新型のオリジナルマイクロ波加熱装置の完成
- (2) MW-RCAへの効果を通じて、マイクロ波加熱の酵素反応への有効性を証明
- (3) 無細胞発現系へのマイクロ波加熱効果を検証

3. 研究の方法

(1) 新型のマイクロ波加熱装置の作製

マイクロ波による50 μLスケールを正確に温度制御するために、マイクロ波装置作製を(株)サイダ・FDSに依頼した。

(2) マイクロ波遺伝子増幅反応

一定温度で増幅できるRolling Circle Amplification (RCA)で、75塩基の環状鋳型と4種のDNA polymerase (*Bst* DNA polymerase,

Large Fragment, *Bst* DNA polymerase, Full Length, 96-7 DNA polymerase, *Bsu* DNA polymerase)を用い、マイクロ波による増幅の促進を、EtBrまたはSYBR Green Iで染色し、電気泳動と蛍光プレートリーダーでマイクロ波加熱効果を検証した。

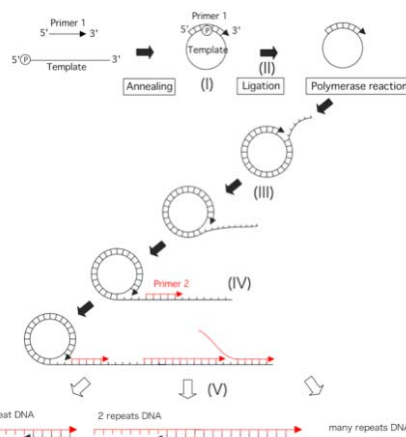


図1 Rolling Circle Amplification 増幅法

(3) マイクロ波無細胞発現系

無細胞発現系として、大腸菌再構築系 PURE SYSTEMを用い、発現蛋白質を蛍光蛋白質 GFPとし、遺伝子配列の設計をおこなった。GFPの発現を、蛍光スキャナ、蛍光プレートリーダー、SDS-PAGEにより評価した。

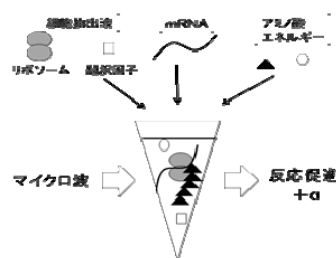


図2 マイクロ波無細胞発現系

4. 研究成果

(1) 新型のマイクロ波加熱装置の作製

2011年11月に、共振空洞型マイクロ波装置本体が完成した。本機は、既存品と比して2つの大きな特徴を持つ。一つ目の特徴は、発信源が最小出力数十Wのマグネトロンではなく、固体素子であるためmWクラスからの出力が可能である。よって、50 μLの微量スケールの加熱を調整可能である。二つ目の特徴は、シングルモードの共振空洞の設計のため、進行波タイプより再現性が高く、均一な電界を照射可能である。また、サンプルの温度測定は、IRによる非接触の温度制御が困難であることがわかり、2012年5月に光ファイバー温度計制御による装置改良をおこなった。以上より、酵素反応に最適な、オリジナルのマイクロ波加熱システムを構築することができた(図3)。

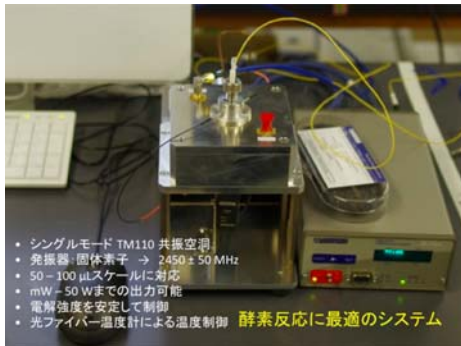


図3 共振空洞 TM110 マイクロ波加熱装置

(2) マイクロ波遺伝子増幅反応

マイクロ波加熱装置の加熱の正確性と再現性を図4に示す。遺伝子増幅 RCA 反応を加熱サンプルとし、1.5 W、2450 MHz のマイクロ波を照射し続け、光ファイバー温度計で温度上昇をモニタした。外気は4℃のため加熱約5分で平衡に達した。50 μL の水系のサンプルのマイクロ波による加熱にもかかわらず、非常に再現良く温度プロファイルを得ることができた。

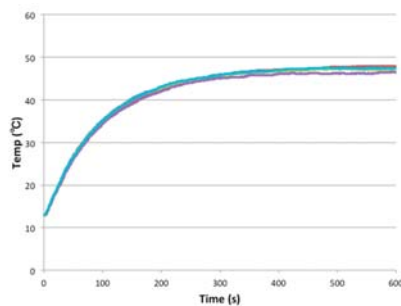


図4 RCAにおける加熱の再現性 (60℃)

また、遺伝子増幅反応 (Rolling Circle Amplification) におけるマイクロ波加熱をおこない、4種の DNA Polymerase で反応時間の短縮を達成した。96-7 DNA polymerase, Large Fragment の結果を図5、図6に示す。

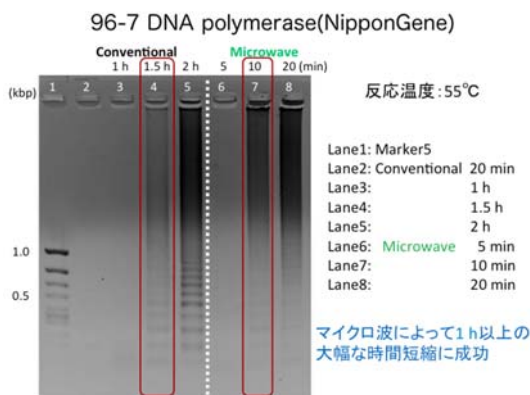


図5 96-7 DNA polymerase を用いた RCA におけるマイクロ波加熱と通常加熱の遺伝子増幅の比較 (電気泳動)

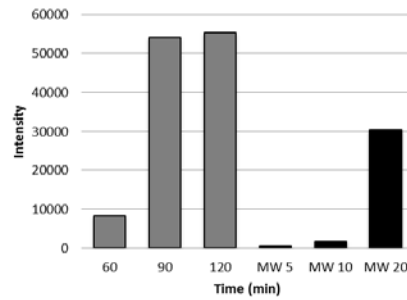


図6 96-7 DNA polymerase を用いた RCA におけるマイクロ波加熱と通常加熱の遺伝子増幅の比較 (蛍光強度)

図5, 6で示したように、他の DNA polymerase においても増幅の促進を確認することができ、マイクロ波加熱により酵素反応を促進することが証明できた。現在なぜ反応が促進されたかについて調べており、結果をまとめて論文投稿予定である。

(3) マイクロ波無細胞発現系

大腸菌系無細胞発現系を使った蛍光蛋白質 GFP の発現におけるマイクロ波加熱による発現は、SDS-PAGE で確認できるほどの発現量の違いは観察できなかった。一方、蛍光プレートリーダーと蛍光スキャナによる蛍光強度の比較では、2倍程度の強度の増加を再現性良く達成することができた。これは新たな発見であり、現在マイクロ波加熱による発現の違いを調べるため、他の蛋白質の発現を検討中である。

まとめ

助成期間中に3つの成果を得た。(1) オリジナルのマイクロ波加熱システムを完成した。(2) マイクロ波加熱により、ローリングサークル型の遺伝子増幅の促進を証明した。また、(3) 無細胞発現系へのマイクロ波加熱の効果として、GFP の蛍光量増加を発見した。

本助成の意義は、大きく2つあったと考える。一つ目の意義は、科学研究費助成のおかげによって、挑戦的萌芽に相応しい積極的な研究内容で、マイクロ波と無細胞発現系による GFP の蛍光量増加という驚くべき発見を見つけたことである。マイクロ波と無細胞発現の組み合わせというまったく新しい発想でチャレンジした結果、これまでの知見を活かして企業との新型の装置開発により、新しいサイエンスの可能性の芽吹きを発見することができた。挑戦的萌芽に相応しい内容であったと考える。

二つ目は、微量スケール専用のオリジナルのマイクロ波装置の開発ができた点である。

本装置完成までに、2年の助成期間の半分の時間を費やし、助成して頂いた研究費の70%近くの投資をおこない、信頼できる装置を目指した。本装置は、これまで報告された論文中のマイクロ波装置に比べ、微量スケールに加熱に対して、温度制御の観点から明らかにベストな装置だと考えている。有機反応や無機反応になどのマイクロ波加熱による研究は、いかに設定通りに加熱や制御が実現できているかのハードウェアの性能が研究の急所である。報告されている論文には、低精度と思われる装置や、怪しい温度測定もあり、再現性の観点からデータを鵜呑みにできない現状がある。本装置を使い、遺伝子や無細胞発現以外のバイオの反応を試すことにより、マイクロ波加熱の有用性を示すことができる。再現性の高いデータを示すことで、サイエンスとして貢献できると考える。さらに、本装置でデータを出すことで、本機が微量スケール用のマイクロ波装置としてスタンダードな装置となれるよう微力ながら日本企業へ貢献したいと考える。最後に、本研究の成果は、科学研究費を助成して頂いたおかげであり感謝申し上げる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 6件)

- ① 吉村 武朗、鈴木嵩将、根本直人、峯木茂、大内将吉、マイクロ波加熱によるローリングサークル DNA 増幅反応の促進、日本化学会、2013. 03. 25、立命館大学
- ② 吉村 武朗、マイクロ波促進遺伝子増幅反応、第6回 日本電磁波エネルギー応用学会研究会(招待講演)、2013. 01. 15、産総研 臨海副都心センター
- ③ 鈴木嵩将、吉村 武朗、峯木茂、大内将吉、酵素を用いた DNA 合成におけるマイクロ波効果の研究、日本電磁波エネルギー応用学会、2012. 10. 04、京都大学
- ④ 吉村 武朗、マイクロ波照射下での遺伝子増幅反応、九州工業大学大学院 生命情報工学研究系主催セミナー(招待講演)、2012. 01. 06、九州工業大学
- ⑤ 鈴木嵩将、吉村 武朗、峯木茂、大内将吉、共振空洞型マイクロ波装置による Rolling Circle Amplification 反応、日本電磁波エネルギー応用学会、2011. 11. 30、パシフィコ横浜
- ⑥ 吉村 武朗、峯木茂、大内将吉、マイクロ波によって培養した大腸菌の電子顕微鏡観察、日本電磁波エネルギー応用学会、2011. 11. 30、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1件)

・吉村 武朗、大内将吉、シーエムシー出版、マイクロ波化学プロセス技術 II 第4章マイクロ波化学のバイオテクノロジーへの応用、2013、180-188

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 武朗 (YOSHIMURA TAKEO)
東京理科大学・理工学部応用生物科学科・助教
研究者番号：10580938