

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550148

研究課題名(和文) プロテオミクス基盤技術としてのオンチップ無細胞遺伝子工学創成

研究課題名(英文) On-chip cell-free genetic engineering as a research technology for proteomics

研究代表者

野島 高彦 (NOJIMA TAKAHIKO)

北里大学・一般教育部・講師

研究者番号：00291930

研究成果の概要(和文)：酵素的な DNA 増幅反応と、増幅された DNA をオンチップ電気泳動で分離する手段を組み合わせることにより、遺伝情報の発現に必要な配列をコードした DNA の組換え、組み替えられた目的 DNA の選別、DNA から mRNA への転写、mRNA からタンパク質への翻訳、翻訳されたタンパク質の検出までの一連の流れを、細胞の助けを借りることなく達成する手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：An experimental system has been developed to achieve recombinant DNA and gene expression without living cell by enzymatic reactions and on-chip electrophoresis of DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA, GFP, PCR, キャピラリー電気泳動, タンパク質, プロテオミクス, 翻訳

1. 研究開始当初の背景

遺伝子工学的手法により調製された組み換え蛋白質は、生体関連化学分野研究における研究材料としても広く用いられるようになってきた。一般的な遺伝子工学的手法は、目的遺伝子を何らかのかたちで単離・精製し、必要に応じて核酸塩基配列レベルでの改変を施し、望ましい組み合わせのものを選択的に単離した後、バクテリアにより蛋白質生産を行うというものであり、これは分子生物学研究や生化学研究を行う研究施設においてルーチンワークとして行われているものである。

ここで、バイオハザード施設の必要性が問題となる。人工的に改変した遺伝子をバクテ

リアなどの宿主細胞に導入する作業を行うにあたっては、専用の施設を用意することが義務づけられており、生化学や生物学を研究領域としてこなかった研究者が、新たに遺伝子工学的手法を採り入れようとする際に大きな障壁となっている。こうした現状を考えると、生細胞への遺伝子導入を一切必要とすることなく遺伝子改変から蛋白質生産までの流れを可能にする化学的手法が実現することによって、蛋白質調製を必要とする各種分野の進展に貢献できるものと期待される。

2. 研究の目的

本申請課題の目標は、生体高分子の選択的操作技術に、適切な酵素反応を組み合わせる

ことによって、生細胞を用いることなく従来の遺伝子工学と同様の操作を達成することである。

従来の遺伝子工学実験においては、生細胞を用いる段階が2箇所ある。1箇所は目的とする遺伝子に改変操作を施した後に発現ベクターへ載せ替え、望ましい組み合わせのDNAだけを選択する段階であり、もう1箇所は発現ベクターを用いて蛋白質発現を行う段階である。後者に関してはこれまでに無細胞蛋白質合成系の研究が進んだ結果、様々な種類の蛋白質が、バイオハザード施設を必要とすることなく得られるようになった。

その一方で、遺伝子改変を行った後の目的構成遺伝子を単離する段階は、バイオハザード施設における作業に依存したままである。これは、DNAの連結操作の結果、無数の組み合わせパターンが生じるうえ、それらの中から望ましい種類の組み合わせだけを選別することが困難であり、生細胞を用いたスクリーニングが行われているからである。

しかし、何らかの手法を用いて無数の組み合わせパターンの中から望ましい組み合わせの一種類を単離することができれば、ここからPCRなどの手法で増幅を進めることができるので、これら問題点は解決される。

そこで本申請課題においては、特定DNA分子を混合物中から単離するDNA分離用キ

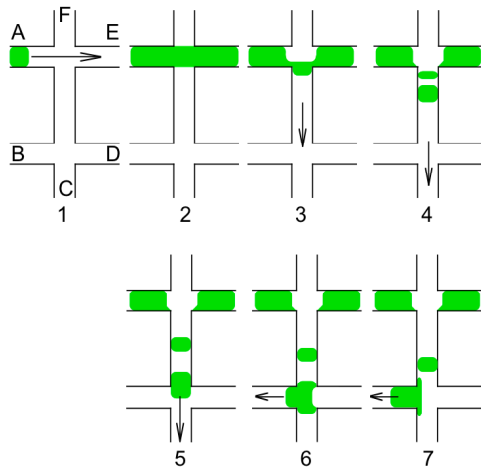


図1 オンチップ・キャピラリー電気泳動法を用いる目的鎖長DNAの分離。(1)AからEに向けて混合物を泳動させ、(2)混合物がAE間に満たされた段階で(3)電圧をFからCに向ける。(4)混合物は下に向かいながら分離され、(5)目的物を主成分とするバンドが次の十字路にさしかかったタイミングで、(6)電圧をDからBにかけると(7)目的物を主成分とする混合物を回収することができる。

ャピラリー電気泳動マイクロ化学チップを開発し(図1)、これを無細胞蛋白質合成システムと組み合わせることによって、この技術課題を解決することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)オンチップDNA電気泳動法の確立

ガラス基板上に蒸着処理によって電極を構築し、この上に透明シリコン樹脂PDMS製の流路を搭載することによって、数 μL の水溶液を電気泳動可能なマイクロチップとした。このチップを用いて、鎖長1,000塩基対程度のDNA分子を、鎖長の異なるDNA分子を10種類以上含む混合物中から選別する方法を確立した。

(2)連結反応混合物からの目的DNA分離

10種類以上のDNA分子を鎖長の差だけで分離することは困難であるため、目的分子を前もって増幅しておき、分離操作を容易にする手法を開発した。DNA連結酵素を用いてDNA連結反応を行った後の反応液に対して直接的にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅反応を行うことによって、混合物中の目的物存在比を高める方法の条件を最適化した(図2)。

(3)無細胞蛋白質合成ポートの導入

無細胞転写・翻訳反応を行うポートをチップ内に設けるための条件を検討した。無細胞蛋白質合成反応によって調製される産物

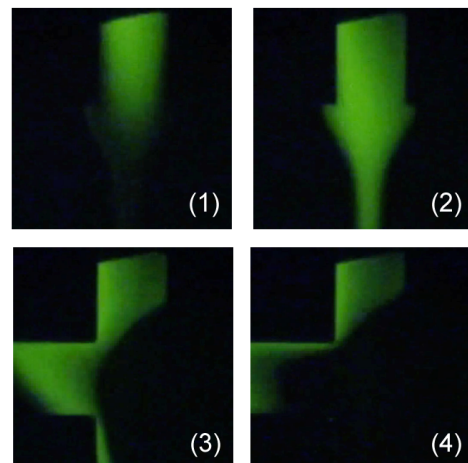


図2 オンチップ・キャピラリー電気泳動を用いた目的鎖長DNA分子の分取操作の実際。緑色蛍光色素で可視化されたDNA混合物のうち、目的分子を主成分として含む領域を回収した。(1)上から下にむけてDNAを泳動させ、(2)混合物が流路内の十字路にさしかかったタイミングで(3)泳動方向を右から左に変え、(4)目的DNAだけを回収する。

蛋白質の量は、反応スケールおよび鋳型 DNA の量に依存する。そのため、蛋白質合成ポートのサイズを検討した。

4. 研究成果

(1) 酵素反応とオンチップ DNA 電気泳動法を組み合わせた目的 DNA 分子の選別

2 種類の DNA フラグメントを、DNA 連結酵素により連結して得られる混合物に対して PCR を行い、この反応における主生成物をオンチップ・キャピラリー電気泳動で分離し、再度 PCR で増幅することによって、無細胞蛋白質合成系用の鋳型を無細胞的に調製する手法を確立することができた(図 3)。

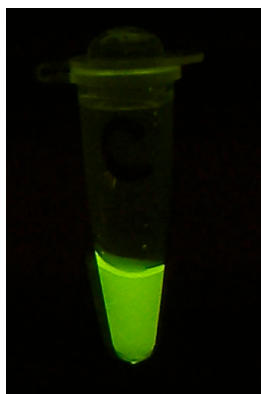


図 3 オンチップ・キャピラリー電気泳動により回収された DNA 分子を鋳型とするタンパク質合成反応。オンチップ・キャピラリー電気泳動により回収された DNA に対して PCR による増幅反応を行い、これを鋳型として、原核細胞由来の無細胞転写翻訳システムを用いてタンパク質発現反応を行った。この結果、緑色蛍光蛋白質が正しく発現した。

これによって、バクテリアなどの生細胞を利用することなく、目的配列を有する組換え DNA 分子を調製することが可能になった。

(2) マイクロ空間内における蛍光蛋白質発現反応

医用工学分野において広く用いられているシリコン樹脂 PDMS を用いて、直径 3.0 mm、体積 19 μL の微小空間を 108 個もつ平行反応チップを作製した(図 4)。

この内部において、GFP 遺伝子およびこの遺伝子を発現させるために必要な転写関連配列および翻訳関連配列をコードした組換え DNA 分子からの GFP 発現を達成した。GFP が発現している状態で長波長紫外線を照射することにより、緑色蛍光を観察することができた。これにより、DNA 変化からタンパク質発現までの全ての段階が正しく進

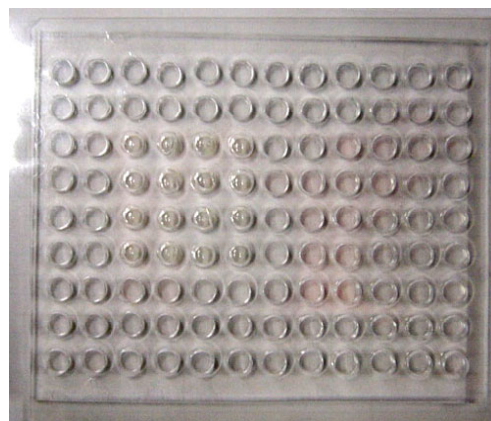


図 4 PDMS により構築された微小空間を 108 個もつ平行反応チップ。反応空間として用いる、直径 3.0 mm、体積 1.9 μL の穴が 108 個空いている PDMS 製のソフトプレートを、ガラスプレート上に吸着させて構築した。

行したことが示された。

(3) 論理判断機能を有する遺伝情報発現システムの実現

DNA からタンパク質への情報-機能変換プロセスを人工空間で達成できたので、このシステムを高度化し、分子で構成される論理判断機構を開発した。

DNA 増幅反応におけるプライマー入力パターンと増幅反応有り/無しとの関連を任意に関連づけるため、DNA レベルでの配列を設計した。DNA 増幅反応の有り/無しは、増幅 DNA にコードされた GFP 遺伝子の無細胞発現によって確認した。その結果、DNA 増幅反応と無細胞タンパク質合成反応を組み合わせることによって、論理ゲートを構築可能であることが示された。

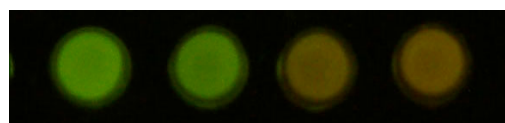


図 5 マイクロ空間内における無細胞タンパク質合成反応を利用した緑色蛍光蛋白質の発現。左から順に発現あり、あり、なし、なし、の 4 パターンを示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Shohei Kaneda, Koichi Ono, Tatsuhiro Fukuba, Takahiko Nojima, Takatoki Yamamoto, Teruo Fujii, Electrophoresis, 査読有, Vol. 31, No.

- 22, 2010, pp. 3719-3726
- ② Hideyuki F. Arata, Frederic Gillot, Takahiko Nojima, Teruo Fujii, Hiroyuki Fujita, Lab on a Chip, 査読有, Vol. 8, No. 9, 2008, pp.1436-1440
- ③ Takahiko Nojima, Takatoki Yamamoto, Hiroshi Kimura, Teruo Fujii, Polymerase chain reaction-based molecular logic gate coupled with cell-free transcription-translation as a reporter, Chemical Communications, 査読有, No. 32, 2008, pp.3771-3773
- ④ Takahiko Nojima, Hiroshi Kimura, Teruo Fujii, Cell-free protein synthesis conducted by template DNA with repetitive sequence, Chemistry Letters, 査読有, Vol. 37, No. 6, 2008, pp. 648-649

[学会発表] (計 6 件)

- ① 野島 高彦, DNA 増幅反応と生体外蛋白質合成を組み合わせた分子論理ゲートシステムの構築, 日本化学会第 91 春季年会, 神奈川大学横浜キャンパス, 2011 年 3 月 26 日(土)-29 日(火)
- ② Takahiko Nojima, PCR-based biomolecular logic gate, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Hawaii, USA, December 15-20, 2010
- ③ 野島 高彦, Fluorescent green logic, 第 11 回生命化学研究会～生命化学をシステムで捉えたら～, 水上館(群馬県みなかみ町), 2008 年 11 月 28 日(金)-29 日(土)
- ④ 野島 高彦, 同一遺伝子を繰り返しコードした鋳型 DNA からの無細胞蛋白質合成, 第 57 回高分子討論会, 大阪市立大, 2008 年 9 月 24 日(水)-26 日(金)
- ⑤ 野島 高彦, PCR に基づく生化学ロジックゲート, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 東京工業大学すずかけ台キャンパス, 2008 年 9 月 18 日(木)-20 日(土)
- ⑥ 野島 高彦, DNA 増幅と遺伝子発現にもとづくロジックゲート構築のこころみ, 第 17 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (17th CHEMINAS), 九州大学馬出キャンパス, 2008 年 5 月 20 日(火)-21 日(水)

[その他]

- ① 招待講演(一般教育担当教員対象の研究紹介): 野島 高彦, 生体高分子を構成要素とする分子情報処理システム構築の

こころみ, 北里大学一般教育部セミナー, 北里大学(神奈川県相模原市), 2011 年 2 月 21 日(月)

- ② 招待講演(中高理科・工業科教員対象の研究紹介): 野島 高彦, 生体分子を用いた情報処理システム構築のこころみ, 白門応用化学教職員会, 航空会館(東京都港区), 2010 年 8 月 22 日(日)
- ③ 招待講演(国際会議における研究紹介): Takahiko Nojima, PCR-based logic gate system, Taiwan-Japan Bilateral Symposium on Research and Education of Nanotechnology 2008, 東京大学生産技術研究所, 2008 年 10 月 26 日(月)-27 日(火)
- ④ 招待講演(学部生から大学院生対象の講演会): 野島 高彦, 生体高分子を用いた情報処理システム構築のこころみ, 中央大学理工学部, 2008 年 7 月 10 日(木)
- ⑤ 研究の一部が英国王立化学会刊行の Chemical Science 紙の第一面で紹介された。2008 年第 8 号 1 面, Jellyfish protein glows to demonstrate logic gate success/Fluorescent green logic. オンライン版の URL は http://www.rsc.org/Publishing/ChemScience/Volume/2008/08/Fluorescent_green_logic.asp
- ⑥ 研究内容は代表者のホームページにて紹介している。URL は <http://www.takahiko.info/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野島 高彦 (NOJIMA TAKAHIKO)

北里大学・一般教育部・講師

研究者番号: 00291930

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号: 30251474