

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14260

研究課題名(和文)Efficient polymerase chain reaction from single DNA molecules

研究課題名(英文)Efficient polymerase chain reaction from single DNA molecules

研究代表者

張 翼 (Zhang, Yi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・研究員

研究者番号：40795358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：測れないものは研究できない。本研究は、立案時からこの最も単純なフィロソフィーを駆動力とし、その下で実施してきたものである。本研究は、大量のDNA一分子を研究対象とし、そこから派生してきた、(1) DNA一分子からの超並列化タンパク質合成、(2) DNA一分子遺伝型とタンパク質表現型の対応付け、(3) DNA一分子の選択的回収と増幅、(4) 非増幅反応によるDNA一分子検出、の一連の研究開発を成し遂げた。この過程の中で、世界最高活性をもつ酵素の獲得、デジタル・スクリーニング理論の樹立、および世界最高感度をもつDNA消化酵素評価手法の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

The massively parallel, highly uniform, and individually addressable femtoliter droplet array technology offered a high-end standard and new possibilities for future diverse bioanalytical applications. The integrated system also stressed the significance of the multidisciplinary approach.

研究成果の概要(英文)：We cannot study what we cannot measure. This simple philosophy is the basic driving force for analytical chemistry to move forward. This Early-Career Scientists study was also planned and implemented based on this general interest. My research platform features high throughput and deals with a massive number of single DNA molecules, which enabled: (1) cell-free protein synthesis from every single DNA molecule; (2) genotype-phenotype linkage at the single DNA molecule; (3) sorting and amplification for single DNA molecules; and (4) amplification-free single DNA molecule detection. During the period of this research, I succeeded in obtaining the world's most active enzyme capable of hydrolyzing phosphate esters, establishing the novel digital high-throughput screening theory, and developing the world's most sensitive method capable of evaluating the performance of any DNA-cleaving enzymes.

研究分野：Analytical chemistry

キーワード：High throughput Microfabrication Single molecule Enzyme Sensitivity Poisson statistics Image processing Screening

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

A vast majority of microorganisms called VBNC or “Viable But Non-Culturable” cannot be cultured in the laboratory due to either the lack of knowledge about the growth condition or the long doubling time making a cell culture within a reasonable period of time impossible. Because the final purpose in most situations is not the cell culture itself, how to skip the culture process to pursue the study using the unexplored microbial dark matter is gaining considerable attention in recent years. Hence, a basic question is whether a single piece of DNA molecule can be reliably and efficiently amplified. If a single DNA molecule from a single cell can be amplified, the microorganism studies can become independent of culture, which must boost our comprehensive understanding of the survival, adaptation, and evolution of life in the normal or extreme environment.

The lack of rigorous interrogation of the absolute sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) at the single-molecule level can be attributed to the inability to acquire exactly a single DNA molecule, while my proposed technology is able to take up this challenge. Even for digital PCR that is considered to be the technique capable of amplifying single DNA molecules, the scientific community still doubts the reliability of digital PCR. The reliability and efficiency of single-molecule DNA amplification have long been the focus of dispute among researchers or end-users. Recently, it has been known that VBNC microorganisms are present even in the deep seafloor in an extremely low abundance. It is necessary to solve the raised fundamental question, prior to actual experiments dealing with such rare and valuable samples.

2. 研究の目的

This research project aimed to establish a general methodology applicable to the PCR reaction capable of amplifying a single DNA molecule, through rigorous validation based on single-molecule identification and recovery techniques. This project was expected to end the debate across the past decades about the limit of PCR. Meanwhile, the project also intended to apply the newly established single-molecule PCR workflow to a massively parallel cell-free protein synthesis and high-throughput screening.

3. 研究の方法

In contrast to traditional fluorescent staining and covalent modification of DNA itself, the proposed approach confirms the true physical number of DNA molecules via a label-free and cell-free protein expression system. DNA molecules are randomly distributed into each microreactor to trigger the protein expression. Because proteins cannot be synthesized unless the intact DNA is present, and the amount of protein synthesized has been proved to be proportional to the number of DNA molecules, this is the only non-invasive method to date to confirm the existence of DNA with single-molecule resolution. The proposed approach can provide for the first time a controllable validation system, making unambiguous discussions possible.

4. 研究成果

(1) A single DNA molecule can be recovered from a specified femtoliter droplet using a microcapillary (Fig. 1).

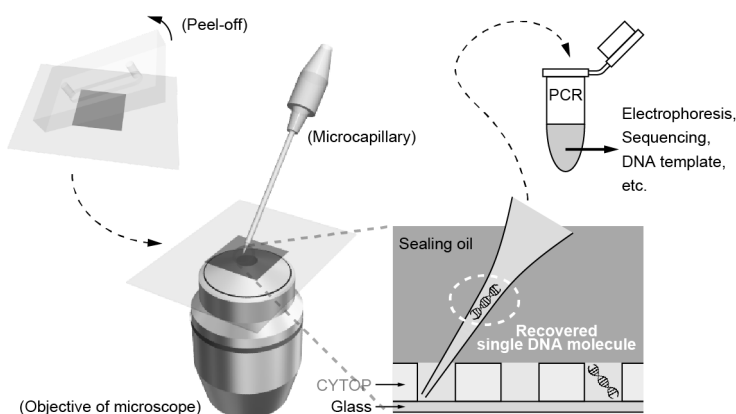


Fig. 1. Schematic workflow for the recovery of single DNA molecules. The silicone rubber (PDMS) can be peeled off from the array substrate before recovery. The recovery is carried out with a glass microcapillary equipped on an XYZ-axis manipulator. The purified DNA can directly be used for various kinds of downstream analyses.

(2) Software development for automatic image analysis of the high-throughput droplet array device (Fig. 2).

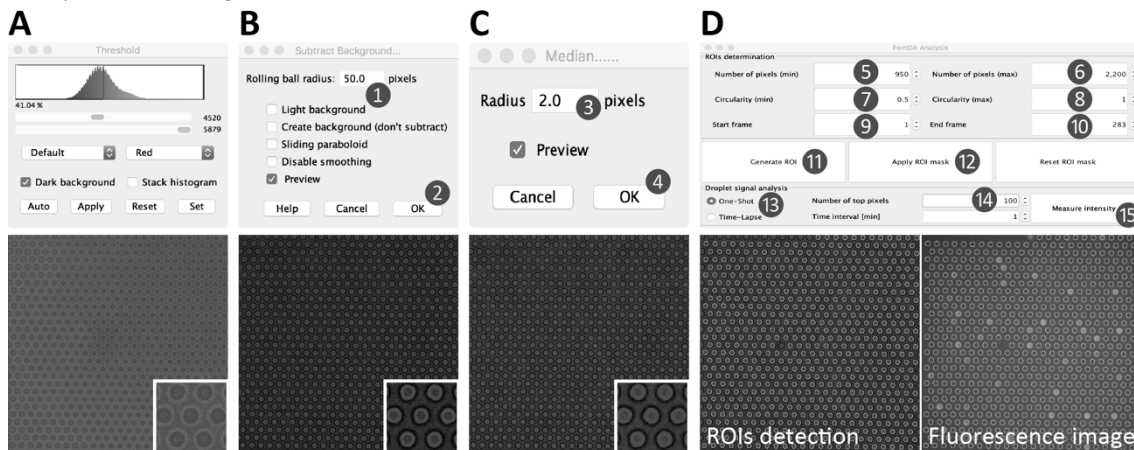


Fig. 2. High-throughput assays require high-throughput analysis software. The newly developed Fiji/ImageJ-based plugin called “FemDA Analysis” enabled fast, reliable, and reproducible image processing and statistical analyses. FemDA stands for femtoliter droplet array. The coordinate of every droplet over the bright-field array can be determined following (A) to (D) steps and (1) to (15) clicks on the GUI (graphic user interface). The determined ROI (region of interest) mask is applied to the corresponding fluorescence image, and the fluorescence intensity of every droplet over the array mask can be extracted, analyzed, visualized, and output using FemDA Analysis.

(3) Proposal of digital HTS (high-throughput screening) theory (Fig. 3) as a new category of digitalized biotechnologies.

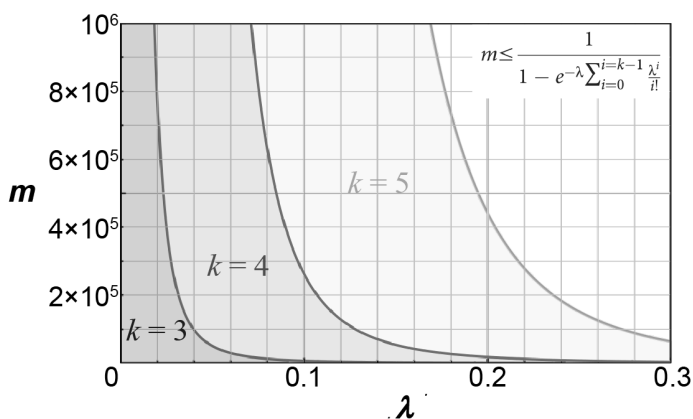


Fig. 3. The DNA library screening based on FemDA must consider a relationship between the number of droplets (m) and the loading concentration of template DNA (λ , which refers to the average number of DNA molecules per droplet), which is nicely expressed by the upper right inequality. The chart visualizing the inequality clearly showed that (1) the higher the activity (parameter k) desired, the higher

the λ that can be applied; (2) the concentration λ is preferably less than a threshold (the semitransparent color-shaded area) to avoid the possible pseudo-hits.

(4) Acquisition of the world’s most active phosphatase using the proposed digital HTS (Fig. 4).

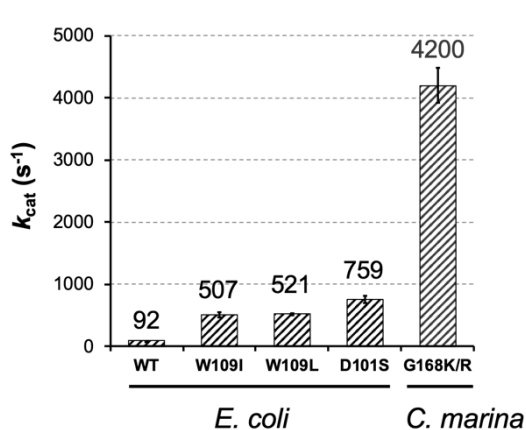


Fig. 4. The wild-type alkaline phosphatase (ALP) from *Escherichia coli* or *Cobetia marina* (a psychrophilic marine bacterium) was subjected to the digital HTS. The statistical model with unprecedented accuracy rapidly identified several mutants with improved activity (k_{cat}). The *C. marina* ALP mutant G168K/R set a new world record in the race of creation of highly active ALP, in just a few days.

(5) Ultrasensitive measurement of restriction digest efficiency of DNA enzymes based on PCR-free single-molecule DNA counting (Fig. 5).

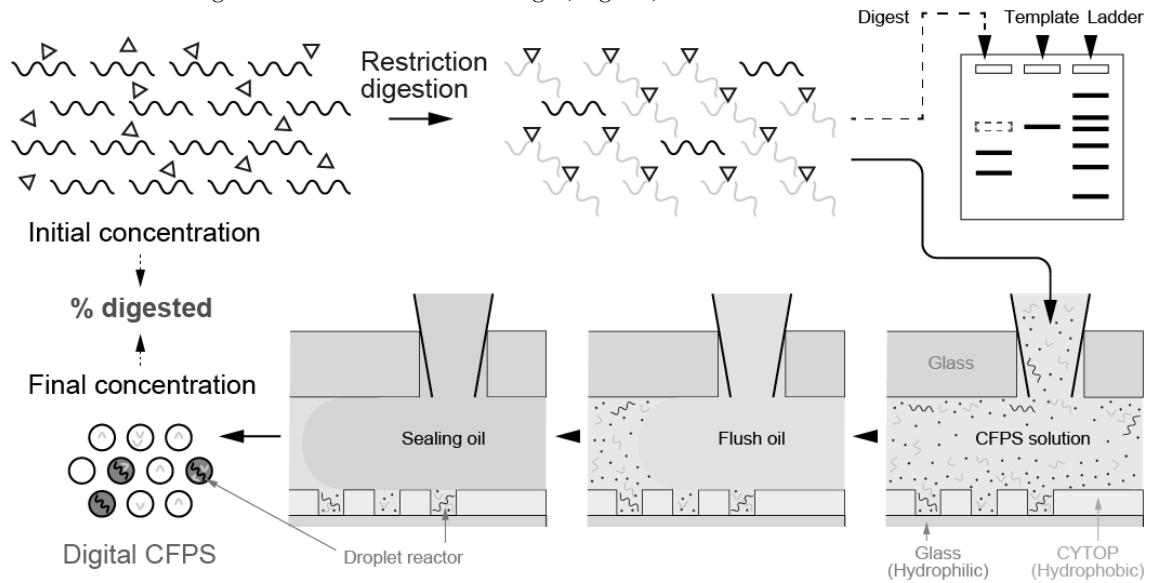


Fig. 5. Basic experimental procedure for quantifying the undigested DNA molecules in a restriction digest. A defined volume of the digest solution is directly mixed with CFPS (cell-free protein synthesis) aliquot. The mixture is introduced into FemDA. Only intact (i. e., undigested) DNA in the droplets can produce functional proteins that can be detected using fluorescence microscopy. The fraction of positive droplets over the array is used to derive the concentration of the undigested DNA. Thus, the residual template DNA that cannot be detected by gel electrophoresis (upper-right scheme) can be detected at the single-molecule level using FemDA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yi Zhang, Takuro Nunoura, Daisuke Nishiura, Miho Hirai, Shigeru Shimamura, Kanako Kurosawa, Chieko Ishiwata, Shigeru Deguchi	4. 巻 15
2. 論文標題 A single-molecule counting approach for convenient and ultrasensitive measurement of restriction digest efficiencies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0244464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0244464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yi Zhang, Kanako Kurosawa, Daisuke Nishiura, Mika Tei, Mikiko Tsudome	4. 巻 (160)
2. 論文標題 A Femtoliter Droplet Array for Massively Parallel Protein Synthesis from Single DNA Molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e60945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/60945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yi Zhang, Yoshihiro Minagawa, Hiroto Kizoe, Kentaro Miyazaki, Ryota Iino, Hiroshi Ueno, Kazuhito V Tabata, Yasuhiro Shimane, Hiroyuki Noji	4. 巻 5
2. 論文標題 Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav8185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aav8185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shingo Sakamoto, Toru Komatsu, Rikiya Watanabe, Yi Zhang, Taiki Inoue, Mitsuyasu Kawaguchi, Hidehiko Nakagawa, Takaaki Ueno, Takuji Okusaka, Kazufumi Honda, Hiroyuki Noji, Yasuteru Urano	4. 巻 6
2. 論文標題 Multiplexed single-molecule enzyme activity analysis for counting disease-related proteins in biological samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay0888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay0888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 張翼
2. 発表標題 海から生まれてきた光るタンパク質にまつわる逸話
3. 学会等名 JAMSTEC一般公開（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 張翼
2. 発表標題 タンパク質デザインのパラダイムシフト
3. 学会等名 海洋生命理工学研究開発課題評価推進委員会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yi Zhang, Takuro Nunoura, Daisuke Nishiura, Miho Hirai, Shigeru Shimamura, Shigeru Deguchi
2. 発表標題 A SINGLE-MOLECULE VIEW OF RESTRICTION DIGESTS
3. 学会等名 第6回新学術領域「ネオウイルス学」領域班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Sakamoto, Toru Komatsu, Rikiya Watanabe, Yi Zhang, Hiroyuki Noji, Yasuteru Urano
2. 発表標題 Development of Novel Disease Diagnosis Platform based on Enzyme Activity Detection at Single Protein Level
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本眞伍、小松徹、渡邊力也、張翼、野地博行、浦野泰照
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いた単一酵素活性検出による病態診断法の開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本眞伍、小松徹、渡邊力也、張翼、井上大輝、川口充康、中川秀彦、植野高章、奥坂拓志、本田一文、野地博行、浦野泰照
2. 発表標題 1 分子酵素活性プロファイリングによる疾患関連酵素の超高感度検出
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi Zhang
2. 発表標題 A cell culture-independent approach for treasure hunting of marine microbial proteins
3. 学会等名 JAMSTEC International Day (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yi Zhang
2. 発表標題 Large-scale femtoliter droplet array for ultrahigh-throughput protein screening
3. 学会等名 CAS KLSMN Forum No. 234 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 張翼
2. 発表標題 異分野融合によるタンパク質探索ツールの開発と応用
3. 学会等名 第97回生命科学若手セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Komatsu, Jun Onagi, Yuki Ichihashi, Shingo Sakamoto, Rikiya Watanabe, Yi Zhang, Hiroyuki Noji, Tetsuo Nagano, Yasuteru Urano
2. 発表標題 Development of enzymomics approach to search for disease-related alternation of enzymatic functions
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi Zhang
2. 発表標題 Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array
3. 学会等名 Fourth Microbial Single Cell Genomics Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yi Zhang
2. 発表標題 Digital protein screening
3. 学会等名 第4回 岡崎発動分子科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸分解酵素の核酸分解効率を求める方法	発明者 張翼, 布浦拓郎	権利者 国立研究開発法人海洋研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、2019-232639	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

「大海撈針にも楽な道がある デジタル・タンパク質スクリーニング・システム」 https://www.jamstec.go.jp/sugar/j/research/20191003/ 「こんな技術が欲しかった」 Blue Earth海と地球の情報誌, 第32巻 第3号 (通巻165号) http://www.jamstec.go.jp/j/pr/blueearth/pdf/BE165all.pdf

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------