

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19360373

研究課題名(和文)

無細胞系分子ディスプレイシステムの構築と応用

研究課題名(英文)

Development and application of cell-free molecular display system

研究代表者：

中野 秀雄 (NAKANO HIDEO)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：00237348

研究成果の概要(和文)：

DNAをマイクロビーズ上にエマルジョンPCRを用いて提示し、さらにそれがコードするペプチドおよび蛋白質を同じビーズ上に提示させる、新規な無細胞系分子ディスプレイシステムを開発した。この手法はフローサイトメーターを用いた高速なスクリーニングに適応可能である。例としてペプチドの進化学、酵素のハイスループットスクリーニング、転写因子結合配列の解析に応用し、その有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)：

A novel biomolecule selection system named ‘Bead Display’ that displays DNA and its encoding protein on the surface of the beads has been developed. Since the system can utilize cell sorter that can analyze and select samples, ultra high-throughput assay at most 10 million samples per an hour can be theoretically possible. As an example, selection of peptides, enzyme, or analysis of DNA binding motifs were successfully demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |
| 2008年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 2009年度 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |
| 2010年度 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：エマルジョンPCR，無細胞タンパク質合成系，マイクロチャネル乳化ペプチド，ビーズディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA, RNA, タンパク質などの生体高分子の新たな機能を自然界から取り出してく

るだけでなく、試験管内で0から作り出すあるいは自然に存在する分子を元を選びすぐれた分子に“進化”させる「進化分子工学」

がめざましく発展しつつあり、抗体工学、タンパク質工学、RNA 工学など様々な分野で応用されつつある。この進化分子工学のプラットフォームとして、生細胞をもちいる生細胞系と、生きた細胞は用いずに細胞抽出液、あるいは酵素を用いる無細胞系とがある。

英国の Griffiths らの研究グループではエマルジョン中で DNA 一分子をビーズに固定化し、無細胞タンパク質合成を行わせタンパク質を提示する方法を既に開発し、ホスファターゼの進化工学に用いている (1)。しかしながらその方法では、ビーズ 1 個あたりのタンパク質量は極僅かしかなく、アッセイ系が高感度な方法に限られるという欠点があった。

申請者らはエマルジョン中の界面活性剤に注目し、95°C という高温にしても安定なエマルジョンの作成に成功し、エマルジョン中で PCR を行うことを可能にした。数千分子の同一 DNA 断片をビーズ上に固定することに成功し転写因子のターゲット配列の解析に応用した (2)。

エマルジョン中での一分子 PCR については、我々のグループ以外に、最近になって米国のグループも報告している (3)。全く生細胞を用いずに、DNA 一分子からの増幅反応によりライブラリーを構築するため、原理的には無限ともいえる膨大な数の分子ライブラリーをマイクロビーズ上に作製できる画期的な手法として、世界的な注目を浴びている。

2. 研究の目的

無細胞の反応系のみで構築された、進化分子工学のためのシステム (ビーズディスプレイ) を開発し、新規タンパク質の創製に応用する。

3. 研究の方法

図 1 エマルジョン PCR 概要

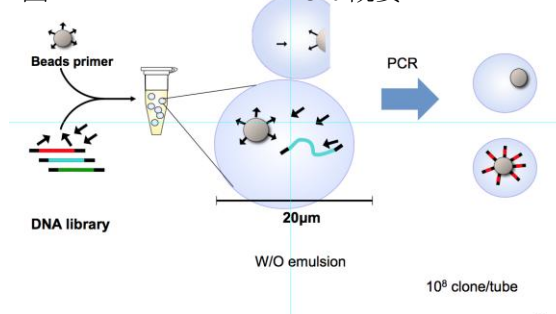


図 1 エマルジョン PCR

申請者らが以前に発表したエマルジョン PCR (図 1) 参照技術により DNA をビーズ上に提示させ、さらにそれを w/o エマルジョン中の水相に内包した無細胞蛋白質合成系により、DNA にコードされる蛋白質をビーズ上に提示した (図 2 参照)。

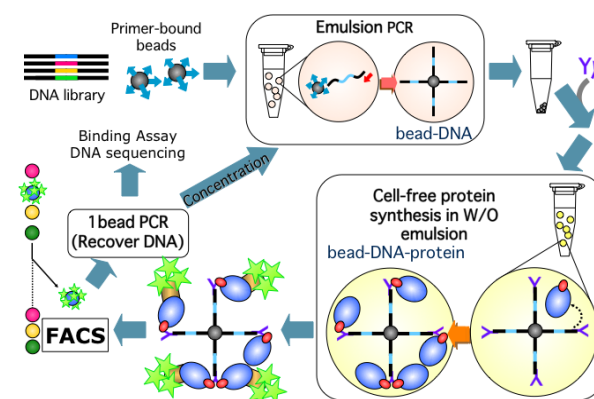


図 2 DNA-蛋白質のビーズディスプレイ

4. 研究成果

1) 蛋白質のビーズディスプレイ法の開発

エマルジョン PCR により DNA をビーズ上にライブラリー化し、さらにエマルジョン中で無細胞蛋白質合成反応を行うことで、ビーズ-DNA-蛋白質複合体を形成した。モデルとしてランダムタグ配列を生じさせ、抗 6 × HisTag 抗体により、結合能を有するペプチドが迅速にスクリーニングできることを示した。

2) ビーズディスプレイによる新規機能分

子のスクリーニング

ビーズディスプレイ法によりアンギオテンシン結合ペプチドを提示し、蛍光標識したアンギオテンシンとの結合を、フローサイトメーターで検出することに成功した。さらにこれらの結合ペプチドにランダム変異を導入したペプチドライブラリーを作製し、結合活性を指標としてセルソーターによりスクリーニングを行った。その結果元のペプチドより高い結合活性を有するペプチドが得られた。

3) ビーズディスプレイによる転写因子結合配列の解析

本手法を援用して、転写因子の結合配列解析に用いることを試みた。モデル転写因子として、糸状菌のアミロース代謝系に関わる AmyR を取り上げた。ランダム DNA 配列をビーズ上にエマルジョン PCR によりディスプレイさせ、そこにタグ配列を付加した転写因子の結合領域を加え、抗タグの蛍光標識抗体を加え、FACS により蛍光標識されたビーズを選択した。その結果 AmyR の DNA 結合のコンセンサス配列として知られている CGGN₈CGG のなかで、N×8 の部分は恐らく何でも良いわけではなく、そこには明確な「好み」があることが判明した。

また得られた配列の中には、ゲノム中に存在し、この転写因子の制御を受ける配列と全く同じものが得られた。これはこの手法が転写因子の網羅的解析方法として有効であることを示している。

4) 糖鎖結合蛋白質解析への応用

大腸菌無細胞系での発現系最適化し、糖鎖結合タンパク質の一つである siglec7 を活性体、すなわちシアル酸結合能を有する形で合成することに成功した。さらにビーズディスプレイさせ、結合能を指標としたスクリーニング系を確

立した。

5) キナーゼ基質スクリーニング法の開発

ペプチドライブラリーをビーズ上に提示し、キナーゼ基質をハイスループットに検出する手法を確立した。

6) 微生物リパーゼのビーズディスプレイ法の確立

Burkholderia cepacia 由来リパーゼを、活性型でマイクロビーズ上に提示させることに成功した。さらにダブルエマルジョンを用いることで、リパーゼの加水分解活性を指標としたハイスループットアッセイ法を確立した。

7) 安定化ビーズディスプレイ法の開発

これまで開発されたビーズディスプレイ法は、抗原-抗体反応により蛋白質をビーズに固定化しているため、高温や低PHなどの極限的環境下では、結合が外れてしまい、スクリーニングすることができない。そこで架橋剤を用いて結合を安定化させ、酵素の耐熱化アッセイに対応したビーズディスプレイ法の確立を試みた。

その結果、熱に対して安定なディスプレイ系を確立することができた。

8) マイクロチャネル乳化を用いた分子セレクション法の開発

マイクロチャネルを用いて均一なエマルジョンを作製し、酵母の分泌酵素のスクリーニングシステムに応用した。

参考文献

- 1) Griffiths and Tawfik, D. S. EMBO J. **22**, 24-35, 2003
- 2) Kojima et al. Nuc Acids Res, **33**, e150, 2005
- 3) M. Margulies et al. Nature. **437**(7057):376-80, 2005

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) Kojima, T. and Nakano, H. GLOBE: Analysis of DNA-Protein Interaction Analysis.

PCR Protocols, Methods in Molecular Biology, J. Park (ed.), 687, 307-317, 2011 (査読無)

2) Kojima, T., Hashimoto, Y., Kato, M., Kobayashi, T. and Nakano, H.

High-throughput Screening of DNA Binding Sites for Transcription Factor AmyR from *Aspergillus nidulans* Using DNA Beads Display System. J. Biosci. Bioeng. 109, 519-512, 2010 (査読有)

3) Gan, R., Furuzawa, S., Kojima, T., Kanie, K., Kato, R., Okochi, M., Honda, H. and Nakano, H. Directed Evolution of Angiotensin II-inhibiting Peptides Using Microbeads Display. J. Biosci. Bioeng. 109, 411-417, 2010 (査読有)

4) Rui Gan, Yumiko Yamanaka, Takaaki Kojima, and Hideo Nakano: Microbeads Display of Proteins Using Emulsion PCR and Cell-Free Protein Synthesis. Biotechnol. Prog. 24, 1107-1114, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1) Hideo NAKANO: Bead Display: A High-throughput Screening Technology of Functional Proteins and DNAs

International Symposium & Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2010. 6. 25 韓国 ソウル

2) Takaaki Kojima and Hideo Nakano: Beads display: A Novel High-throughput Screening Technology to Explore Functional Biomolecules.

The Eleventh China-Japan-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2010. 11. 6, Chengdu, China,

3) 三上友美子、松田英樹、松井大悟、兒島孝明、中野秀雄: ビーズディスプレイ法における DNA-蛋白質複合体の安定化 日本生物工学会 2010 年 62 回大会、平成 22 年 10 月、宮崎

4) 王 ハン輝、兒島 孝明、中野 秀雄: DNA のビーズディスプレイ法を用いた DNA-酵母転写因子相互作用検出システム 日本生物工学会 2009 年 9 月 22 日 名古屋

5) 長尾 伸人、安東 大介、小島 晃代、河原崎 泰昌、兒島 孝明、中野 秀雄: エマル

ジョン培養法による分泌酵素産生菌の選択的濃縮

日本生物工学会 2009 年 9 月 22 日 名古屋
6) 松井 大悟、浅賀 由香理、甘 睿、兒島 孝明、中野 秀雄: ビーズディスプレイ法を用いたリパーゼのハイスループットスクリーニング法の開発

日本生物工学会 2009 年 9 月 22 日 名古屋

7) Takaaki Kojima, Yoko Hashimoto, Masashi Kato, Tetsuo Kobayashi and Hideo Nakano: High-throughput Screening of DNA Binding Sites for Transcription Factor, AmyR, from *Aspergillus nidulans* Using Beads Display System of DNA. 4th Korea-Japan Workshop on Combinatorial Bioengineering, Seoul 2008. 11 月

8) Rui GAN, Yumiko YAMANAKA, Hideo NAKANO: Genotype-Phenotype Coupling Screening of DNA Molecules Displayed on Microbeads by Using Cell-free Protein Synthesis Biocat2008, 2008 年 9 月 3 日 ハンブルグ、ドイツ

9) 兒島孝明、橋本陽子、加藤雅士、小林哲夫、中野秀雄: DNA のビーズディスプレイ法を用いた DNA-転写因子間相互作用検出法 日本生物工学会平成 20 年度大会 2008 年 8 月仙台

10) 古澤聖司, Rui GAN, 中野秀雄: 無細胞蛋白質合成系を用いたマイクロビーズ上での分子ディスプレイ法の開発 日本農芸化学会 2008 年度大会 2008 年 3 月 27 日 名古屋

11) Rui GAN, Yumiko YAMANAKA, Takaaki KOJIMA, Hideo NAKANO: Microbeads Display of Proteins Using Emulsion PCR and Cell-free Protein Synthesis 日本農芸化学会 2008 年度大会 平成 20 年 3 月 27 日 名古屋

12) 橋本陽子、兒島孝明、加藤雅士、小林哲夫、中野秀雄 DNA のビーズディスプレイ法を用いた DNA 転写因子間相互作用検出法 日本生物工学会平成 19 年度大会 2007 年 9 月 26 日 広島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 分子ディスプレイ法およびその用途

発明者: 中野秀雄 古澤聖司

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-018324

出願年月日: 平成 20 年 1 月 29 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野秀雄 (NAKANO HIDEO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：00237348

(2) 研究分担者

岩崎雄吾 (IWASAKI YUGO)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：50273214

(3) 研究分担者

兒島孝明 (KOJIMA TAKAAKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：40509080

(3) 連携研究者

中嶋光敏 (NAKAJIMA MITSUTOSHI)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10343815