

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23360367

研究課題名(和文)無細胞系ギガスクリーニング法の開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of Giga-screening system of by-molecules using cell-free biochemical reactions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質・核酸などの機能分子創製技術は、生命科学・工学、あるいは医療等の産業において、最重要な研究課題のひとつであるものの、これらは精密な分子設計が不可能であるため、膨大なライブラリーを構築し、機能によるスクリーニングする系の開発が欠かせない。本研究では、容積1pL程度の微小液滴中で様々な生化学・分子生物学的反応が可能な系を構築し、酸化還元酵素や、トランスグルタミナーゼ、RNAポリメラーゼなどの酵素を対象として、ギガ(10の9乗)スケールの分子スクリーニングが可能なシステムを構築した。さらに本システムの効率向上を目的として、均一にかつ高速に水/油エマルジョンを作製できる装置も合わせて開発した。

研究成果の概要(英文)：Creation of bio-macromolecules such as proteins, DNA and RNA is important technology both for bio-industries and bioscience, however, functional design of these molecules are generally impossible due to these complexities. In this research, we have developed a high-throughput library construction and screening system enabling giga-scale screening of such molecules using pL volume droplets in emulsion as reaction chamber for these molecules based on biochemical functions such as manganese peroxidase, horseradish peroxidase, and the substrate peptides and promoter sequences of transglutaminase and RNA polymerase, respectively. In addition, hand-made device for making uniform droplets in emulsion formation in a short-time has been also developed to improve the screening efficiency.

研究分野：生物工学

キーワード：無細胞タンパク質合成系 エマルジョン タンパク質 酸化還元酵素 RNAポリメラーゼ 一分子PCR
マイクロビーズ

1. 研究開始当初の背景

近年の蛋白質機能スクリーニング技術は、従来の生細胞を基本として ml スケールのアッセイ系を用いる方法から、ファージディスプレイや細胞表面ディスプレイのような、極微量で非常に多数の候補分子を高速にスクリーニングできる手法の登場により、大きな変化を遂げている。また自然界由来の DNA 資源をそのまま利用するだけでなく、さらに選りすぐれた分子に“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。この高速スクリーニングのプラットフォームとして、生細胞を用いる生細胞系と、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。我々はこれまで主に無細胞系を用いた新規なシステムの開発と、応用研究に取り組んできた。DNA 一分子から PCR により増幅し、無細胞蛋白質合成系により発現させて、蛋白質分子ライブラリーをプレート上だけの反応により発現する技術を確立し、これを用いて単鎖 Fv のアフィニティーの向上 (Rungpragayphan, et al. 2004)、リパーゼの光学選択性の反転 (Koga, et al. J. Mol. Biol. 2003)、マンガンペルオキシダーゼの対過酸化水素耐性の向上 (Miyazaki-Imamura, et al. Protein. Eng. 2003) など蛋白質工学の分野に応用してきた。

これらの成果をふまえ、w/o エマルジョンを用いた pL スケールでの極微細空間中で、マイクロビーズに固定化したプライマーを用いた DNA 一分子からの PCR 反応、およびタンパク質合成反応を行わせ、DNA 分子および蛋白質分子ライブラリーをマイクロビーズ上に構築する、ビーズディスプレイ法を開発し、転写因子のターゲット配列の解析に応用した (Kojima et al. Nuc. Acid Res. 2005, J. Biosc. Bioeng. 2006)。さらに申請者らはビーズ上にエマルジョン PCR で増幅した DNA がコードする蛋白質を同じビーズ上にディスプレイし、ペプチドや蛋白質のスクリーニングに用いるシステムを開発し、セルソーターを用いたハイスループットスクリーニングに成功した (Gan et al., 2008, 2009)。

2. 研究の目的

生命科学・工学、あるいは医療等の産業において、最重要な研究課題のひとつである蛋白質・核酸などの機能分子創製技術の革新を目指し、容積 1pL 程度の微小液滴中でギガ (10の9乗) スケールの分子スクリーニングが可能で、かつ様々な生化学・分子生物学的反応が適用可能な系の構築を目指した。

3. 研究の方法

無細胞系での新規な高速スクリーニングが可能システム構築を目指し (図1参照) エマルジョン作製手法の検討、エマルジョンを用いた培養スクリーニング法の開発、エマ

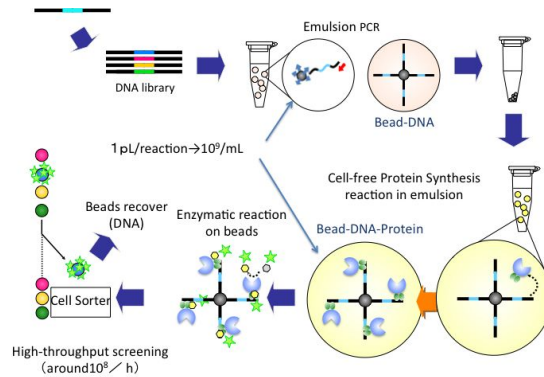


図1 無細胞系スクリーニングシステム概略

ルジョン中での無細胞蛋白質合成系の最適化、エマルジョン中での酵素アッセイ法の開発、ビーズディスプレイ法を用いた結合配列解析等を中心に行った。

またスクリーニング効率の向上のため、短時間で均一な水滴径を有するエマルジョン作製装置の開発も合わせて行った。

4. 研究成果

(1) エマルジョン培養法の開発：水/油系エマルジョンを用いて、水滴中で個別に微生物を培養し、スクリーニングする系の構築を行った。酵母分泌シグナル配列のランダムライブラリーを作製し、LacA と融合して酵母に導入した。1滴のドロップレット中に1菌体以下になるよう分配し、培養を行った。LacA が分泌する場合にのみラクトースが資化でき、酵母は増殖できる (図2参照)。

数回の培養を繰り返すことで、効率的に LacA を分泌させることができる、シグナル配列を取得することができた (発表論文)。

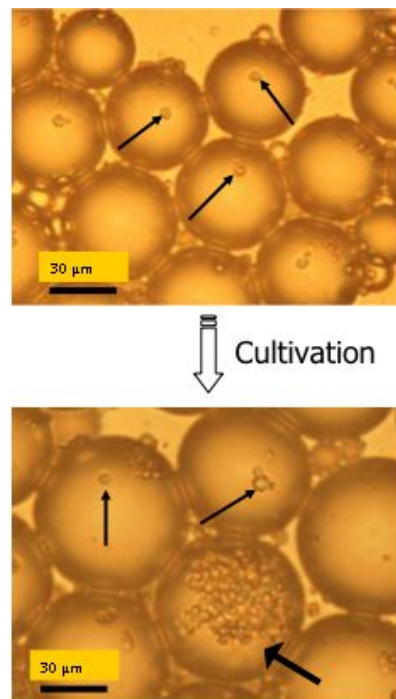


図2 エマルジョン培養法による酵母の選別的増殖

(2) 無細胞タンパク質合成系の効率化：本研究で用いている無細胞タンパク質合成系は、開放系であることから、様々な条件や因子などを加える事ができる。活性中心にヘムを含む酸化還元酵素は、産業利用上有用なものが多いものの、大腸菌での活性体発現は困難である。白色腐朽菌の産するマンガンペルオキシダーゼもそのような酵素の一つである。我々は無細胞タンパク質合成系において低温発現、分子シャペロンの添加などにより本酵素の可溶性発現の効率化に成功した(発表論文)。さらにビーズ上でのアッセイ法を確立した。また以上の知見を踏まえ、大腸菌生細胞における可溶性発現にも取り組み、シャペロン高発現宿主を用いること、発現時の温度を最適化することなどより、可溶性発現を可能にすることに成功した。この成果により今後の本酵素のタンパク質工学的改良等大きく進展すると期待される。

(3) 西洋わさびペルオキシダーゼの無細胞発現およびビーズディスプレイによるスクリーニング法構築：西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)は、免疫染色、検査試薬などのバイオ分野だけでなく、フェノールの除去などの環境分野への利用なども可能な産業上重要な酵素である。しかしながらそれを活性体として大腸菌により合成させることは困難であった。我々はまず本酵素を無細胞タンパク質合成系により、活性体として合成させることに成功した。さらにその反応をエマルジョン中での無細胞タンパク質合成系で行うことに成功し、ビーズ上に活性体として提示することができた(図3参照)。

一方ビオチン化チラミドを化学合成し、HRPの酵素活性によりチラミドが酸化されて活性化状態になり近傍に存在するチロシン残基に結合するという性質を利用して、タンパク質をビオチン化し、その後蛍光アビジンを添加することでFACSスクリーニングに対応したアッセイ系を構築し、モデルライブラリーを用いたスクリーニングに成功した(発表論文)。本手法はHRPのハイスループットスクリーニングを可能にする画期的な技術であり、産業上重要な本酵素のエンジニアリングに役立つことが期待される。

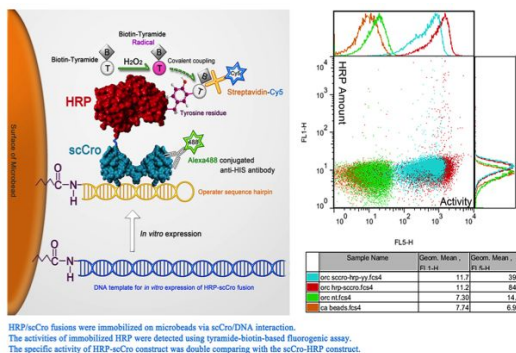


図3 HRPのFACSによる機能スクリーニング

(4) DNA結合タンパク質を用いたビーズデ

イスイ効率化：これまでタンパク質をビーズ上に提示させるために、目的タンパク質(POI)にペプチドタグを付加し、そのペプチドに対する抗体を用いて提示させていた。しかしながら抗体分子の不安定性などにより、高温や低pHなどでのスクリーニングは困難であった。そこでpMオーダーのKd値でターゲットDNAと結合することが報告されている、一本鎖Croタンパク質をタグとして用いることを想起した。このscCroタグの利用により、抗体を介した従来法より約10倍近くビーズ上へのタンパク質の提示量を増大させることに成功した。さらにMnpやペプチドを同じタグを用いて提示し、その活性評価をビーズ上で行うことに成功した(Kojima et al. 論文投稿中)。

(5) DNA提示と転写因子結合DNA配列解析：ランダム配列のDNAライブラリーをマイクロビーズ上にディスプレイさせ、*Aspergillus nidulans* 転写因子AmyRに特異的に結合する配列を取得し、その結合配列を明らかにした(発表論文)。

(6) RNAポリメラーゼプロモーター配列スクリーニング系の構築：マイクロビーズ上にプロモーター配列を提示しておき、エマルジョン中での転写反応によりリボザイムを転写し、その転写数に応じてマイクロビーズ上の蛍光シグナルが増大する反応系を構築した。この系を用いてRNAポリメラーゼのDNA特異性検討が可能であること、さらに大規模ライブラリースクリーニングが可能であることを示した(発表論文)。

(7) ハンドメイド高速エマルジョン作製装置の開発と応用：ライブラリースクリーニングの効率を高めるため、高速にかつ均一なエマルジョンを作製する装置を開発した。いわゆるフローフォーカシング法を用いて、直径20μmから50μm程度の均一なエマルジョンを一秒間に数千個の速度で作製させる装置を開発した。その時の写真を図4に示す。

さらに本装置を用いて、RNAポリメラーゼのアッセイ系などに適用し、より効率的なスクリーニングが可能であることを示した。

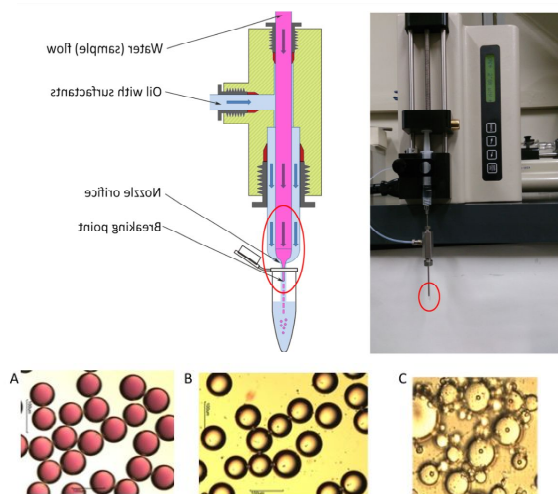


図4 作製したフローフォーカシング法装置(上)および作製したエマルジョン(A, B)とボルテックスを用いたエマルジョンとの比較

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 7 件)

Zhu, B., Mizoguchi, T., Kojima, T., and Nakano, H. (2015) Ultra-High-Throughput Screening of an In Vitro-Synthesized Horseradish Peroxidase Displayed on Microbeads Using Cell Sorter. PLoS One DOI: 10.1371/journal.pone.0127479

R. Ninomiya, B. Zhu, T. Kojima, Y. Iwasaki, and H. Nakano. Role of disulfide bond isomerase DsbC, calcium ions, and hemin in cell-free protein synthesis of active manganese peroxidase isolated from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biosci. Bioeng., 117, 652-657 (2014).

doi:10.1016/j.jbiosc.2013.11.003 査読有
兒島孝明、中野秀雄 「超微細生化学反応系」技術の最前線 化学と生物 52, 159-165 (2014) 査読無 <https://katosei.jsbba.or.jp/>

兒島孝明、中野秀雄 ビーズディスプレイ法を用いた DNA-転写因子間相互作用のハイスループット解析 バイオサイエンスとインダストリー 72, 306-308 (2014) 査読無 <http://www.jba.or.jp/pc/bi/>

T. Kojima, S. Ohuchi, Y. Ito, and H. Nakano. High-throughput screening method for promoter activity using bead display and a ligase ribozyme. J. Biosci. Bioeng. 114, 671-676 (2012)

doi:10.1016/j.jbiosc.2012.06.011 査読有
P. Wang, T. Kojima, T. Kobayashi, and H. Nakano. Comprehensive Analysis of the DNA-Binding Specificity of an *Aspergillus nidulans* Transcription Factor, AmyR, by using a Bead Display System. Biosci. Biotechnol. Biochem., 76, 1128-1134 (2012) doi.org/10.1271/bbb.110949 査読有

Kojima, T., Nagao, N., Ando, D., Ojima, T., Kawarasaki, Y., Kobayashi, I., Nakajima, M. and Nakano, H. (2011) Emulsion Culture: A Miniaturized Library Screening System Based on Micro-droplets in an Emulsified Medium. J. Biosci. Bioeng. 112, 299-303. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.05.017 査読有

[学会発表](計 37 件)

M. Murzabaev, T. Mizoguchi, T. Kojima, I. Kobayashi, H. Nakano. In vitro transcription/translation in emulsion produced by a simple flow-focusing device. 249th ACS National Meeting & Exposition, March, 2015, Denver
B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, Y. Iwasaki, H. Nakano. Cell-free Synthesis of Horseradish Peroxidase and Single-chain Lambda Cro Repressor Fusion Protein for Bead Display-based High-throughput Screening. The 7th International Congress on Biocatalysis

2014. August, 2014. Hamburg, Germany.

兒島孝明、中野秀雄. ビーズディスプレイ法を用いた 1 分子由来 DNA ハイスループットスクリーニング系. 日本生物工学会 2014 年 66 回大会, 平成 26 年 9 月, 札幌.

H. Nakano, E. Ota, B. Zhu, T. Kojima. Bead display of heme enzymes for function-based high-throughput screening. Japan-Italy Joint Symposium. November, 2014, Nara.

H. Nakano: Display of macromolecules on microbeads: a new platform for various screening methods. Enzyme Engineering XXII: Emerging Topics in Enzyme Engineering, 2013, Sep, Toyama

Nakano, H., Wang, P.W. and Kojima, T.: Comprehensive analysis of transcription factor binding site using bead display of DNA. The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012, May, Kanazawa

他

[図書](計 3 件)

- 1) T. Kojima, B. Zhu, and H. Nakano. Construction of a DNA library on microbeads using whole genome amplification. Whole Genome Amplification. Methods in Molecular Biology, T. Kroneis (ed.) in press. 査読無
- 2) 中野秀雄、兒島孝明 無細胞蛋白質合成系の利用技術の新展開-バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発-(山口照英監修). シーエムシー出版, 193-201 (2012) 査読無
- 3) Kojima, T. and Nakano, H. (2011) GLOBE: Analysis of DNA-Protein Interaction Analysis. PCR Protocols, Methods in Molecular Biology, J. Park (ed.), 687, 307-317.

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
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: 40909080
小林 功 (KOBAYASHI, Isao)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・研究員
研究者番号: 70425552