

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770153

研究課題名(和文)無細胞翻訳系を用いた生化学反応への反応場サイズの寄与の解明

研究課題名(英文)A study of the compartment size dependency of the protein synthesis using a cell-free translation system

研究代表者

岡野 太治 (Okano, Taiji)

大阪大学・情報科学研究科・特別科学研究員

研究者番号：60622082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な体積のマイクロチャンバー内でタンパク質合成を行い、反応場サイズが反応に与える影響を調べた。ポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロチャンバーではタンパク質合成量は検出感度以下であったが、石英ガラス製マイクロチャンバーでは反応効率が大幅に改善され、バルクの41%の収量が得られた。体積の異なるチャンバーに無細胞翻訳系を封入し一定分子数のDNAからタンパク質合成を行ったところ、その過程が高次反応の場合に体積依存的な振る舞いが見られた。更に、高次反応では反応産物の収量が最大となる最適な反応場サイズが存在することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the compartment size dependency of the protein synthesis reaction using quartz-glass microchambers. By introducing the glass chamber, the concentration of the synthesized protein was significantly improved compared to that in the poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchamber. The concentration was below the detection limit in the PDMS chambers, whereas the glass chambers yielded 41% of the bulk reaction. When the cell-free protein synthesis reaction with different reaction orders was conducted in glass chambers, the reaction dynamics was largely affected by the chamber size although the synthesis reaction was initiated from a constant copy number of DNA. We were able to observe the properties specific to the high order reaction and found the presence of an optimum compartment volume for a high-order reaction using real biological molecules.

研究分野：生物物理学, マイクロ・ナノデバイス

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：無細胞翻訳系 タンパク質合成 一分子計測 マイクロチャンバー ドライエッチング

1. 研究開始当初の背景

細胞のサイズは数 μm から数 mm まで幅広い。しかし、同種の細胞であればほぼ同じサイズを有している。このことは、各種の細胞に固有のサイズスケールが存在する可能性を示唆している。これまでに、細胞の内部反応や細胞増殖が、細胞サイズと密接に関わっていることが理論的に示されている。内部反応への細胞サイズの寄与を実験的に検証する直接的な方法は、異なるサイズの細胞を用いて、細胞サイズとその内部反応の関係性を明らかにすることである。しかし、この実験手法には、「生細胞のサイズを自在に制御できない」、「細胞内の構成成分が多いため、解析が容易でない」という困難がある。それ故、細胞サイズと内部反応の関係性は実験的に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、再構成無細胞翻訳系 (PURE system) を微小反応場に封入することで細胞の内部環境を再現し、反応場サイズと内部で起こる生化学反応の関係性を実験的に明らかにする。更に、内部反応に最適な反応場サイズが存在する可能性について検証する。

3. 研究の方法

(1) ガラスマイクロチャンバーの作製

マイクロチャンバーの素材として、ポリジメチルシロキサン (PDMS) が広く用いられている。しかし、PDMS 製マイクロチャンバーではタンパク質合成があまり進行しないことが予備実験より明らかになった。そこで本研究では、マイクロチャンバーを石英ガラスで作製した。顕微鏡観察の要請から、ガラスチャンバーをカバーガラスで密閉しなければならないが、ガラス同士をそのまま接着することは困難である。そこで、チャンバー基板表面に PDMS 薄膜を形成することでカバーガラスとの接着性を確保し、内封液の漏洩を防いだ。内封液の漏洩の有無は、光褪色後蛍光回復 (FRAP) 実験によって確認した。

ガラスマイクロチャンバーの作製工程を図 1 に示す。ヘキサシロキサン (PDMS) を石英ガラス上にスピコートすることで、PDMS 薄膜を形成した (図 1 (i))。PDMS 膜を酸素プラズマによって浸水処理した後、フォトリソグ

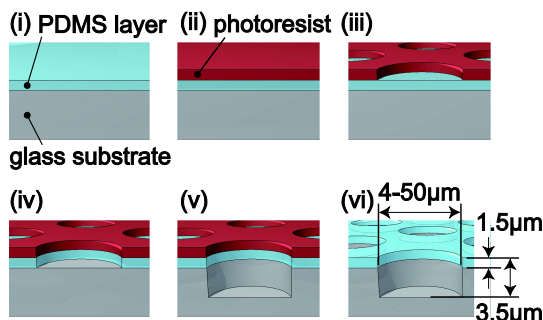


図 1 ガラスマイクロチャンバー作製工程。

ンコートした (図 1 (ii))。フォトリソグラフィによりチャンバーの形状をフォトリソレジストに転写し、これをエッチングマスクとした (図 1 (iii))。PDMS 薄膜を O_2/SF_6 プラズマでエッチングし (図 1 (iv))、続いてガラス基板を CHF_3 プラズマでエッチングした (図 1 (v))。最後に、アセトンでフォトリソレジストを除去した (図 1 (vi))。

(2) マイクロチャンバー内での GFP 合成

(1) で作製したガラスマイクロチャンバー内で、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の合成を試みた。チャンバーに PURE system と GFP をコードする DNA 30nM を封入し、 37°C で 2 時間反応させた。蛍光顕微鏡を用いて蛍光強度の経時変化を観察した。得られた結果を、PDMS 製マイクロチャンバーで行った同条件の実験の結果と比較した。

(3) DNA 1 分子からのタンパク質合成

チャンバーあたり平均 1 分子の DNA が封入されるように DNA 濃度を調整した反応液をマイクロチャンバーに封入し、DNA 1 分子からのタンパク質合成反応の検出を試みた。実験では、GFP 又は β -ガラクトシダーゼ (GAL) の合成反応を観察した。GAL 活性の検出には、蛍光原基質 FDG を用いた。FDG 自体は無蛍光性であるが、GAL により加水分解されると緑色蛍光を呈するフルオレセインが得られる。この反応液をガラスマイクロチャンバーに封入し、顕微鏡下で 37°C 、2 時間反応させ、蛍光画像を取得した。

(4) 反応場体積依存性の検証

三種類の異なる体積 (56, 126, 350fL) のマイクロチャンバー内に DNA を平均 70 分子封入し、PURE system を用いてタンパク質合成を行った。反応ダイナミクスの違いによる影響を調べるため、反応次数の異なる二種類のタンパク質 (β -ガラクトシダーゼ (GAL)、 β -グルクロニダーゼ (GUS)) をそれぞれ合成した。GAL, GUS はいずれも単量体から二量体を経て四量体を形成して初めて活性を持つ酵素であるが (図 2)、律速段階の違いから合成反応はそれぞれ 1 次反応、4 次反応であることが分かっている。実験では、GAL (又は GUS) をコードする DNA と蛍光原基質 TG-Gal (又は TG-GlcU) を添加した PURE system をチャンバーに封入し、顕微鏡下で 37°C 、2 時間反応させた。

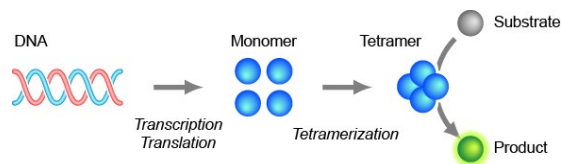


図 2 GAL, GUS の合成と活性検出。

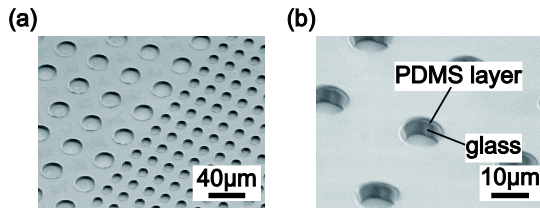


図3 ガラスマイクロチャンバーの電子顕微鏡写真.

4. 研究成果

(1) ガラスマイクロチャンバーの作製

① 主な成果

PDMS 薄膜を接着層として持つガラスマイクロチャンバーが作製できた (図3). GFP を封入したチャンバーで FRAP 実験を行い, PDMS 膜の厚さが $1.5\mu\text{m}$ 以上であれば内封物の漏洩が起こらないことが分かった.

② 国内外におけるインパクトと今後の展望

本研究で作製したガラス製マイクロチャンバーは, 内封液が接触するチャンバー内壁部分のほとんどがガラスである. そのため, PDMS 製チャンバーで起こる PDMS への内封液の吸収や封入物質の拡散を抑えることができる. そのため, 低分子成分を多く含む反応系などへの応用が期待される.

(2) マイクロチャンバー内での GFP 合成

① 主な成果

マイクロチャンバーの作製には, PDMS が広く利用されている. しかし, PDMS によって反応が影響を受けることが指摘されており, 本実験でも GFP 合成反応が阻害された. そのため, PDMS 製マイクロチャンバーでは, GFP 合成量は検出感度以下であった. 一方, BSA とアミノ酸で表面をブロッキングしたガラスマイクロチャンバーでは著しい反応抑制は起こらず, 反応の初速, GFP 合成量ともにバルク反応の約 $1/2$ 程度であった.

② 国内外におけるインパクトと今後の展望

ガラスマイクロチャンバーを用いることで, PDMS 製チャンバーに比べて反応効率が大きく改善した. 更に, タンパク質合成のような複雑な反応でも, 高い反応効率を示したことから, 今後ガラスマイクロチャンバーの生化学反応への応用が期待される.

(3) DNA 1 分子からのタンパク質合成

① 主な成果

多くのチャンバーの蛍光強度はバックグラウンドと同程度であったが, 一部では異なる強度の蛍光が観察された (図 4a). チャンバーの蛍光強度のヒストグラムをプロットしたところ, 離散的な複数のピークが得られた (図 4c). 混合 Gauss 分布によるフィッティングやチャンバーへの DNA 封入数の理論値などから, これらのピークがチャンバーに封入された DNA 分子の数に対応したシグナルであることが分かった. 以上より, DNA 1

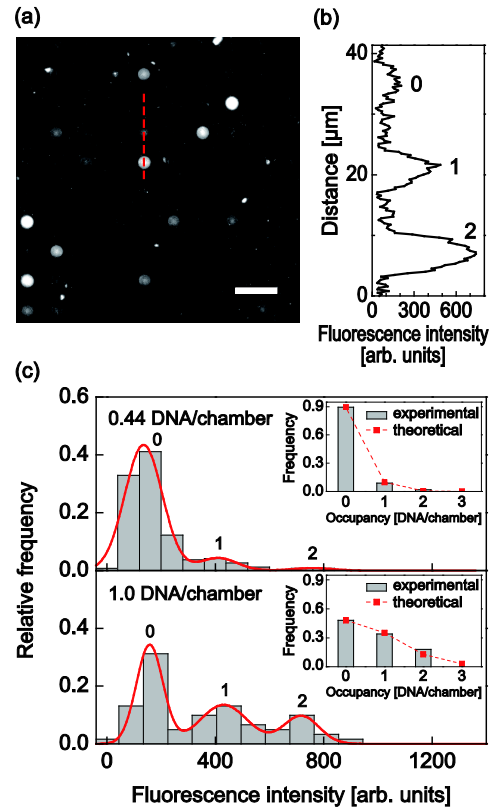


図4 DNA 1 分子からの GFP 合成. (a) 2 時間反応後の蛍光顕微鏡画像. スケールバーは $20\mu\text{m}$. (b) 赤点線部の蛍光強度. (c) チャンバーの蛍光強度のヒストグラム. 異なる DNA 濃度 ($0.44, 1.0 \text{ DNA/chamber}$) であっても, ほぼ同じ強度でピークが検出された. インセットは, ポアソン分布から導かれるチャンバーあたりの DNA 封入数の期待値 (理論値) と実験値の比較.

分子レベルで GFP, GAL の合成反応を観察でき, 更に DNA 封入数に応じたシグナルを検出できたと考えられる.

② 国内外におけるインパクトと今後の展望

PCR や酵素反応などに関する 1 分子レベルでの研究が既に報告されているが, 本研究で提案したガラスマイクロチャンバーを用いることで, 多数の成分から成るより複雑な反応を 1 分子レベルで観察できることが示された. これにより, 細胞内で見られる情報伝達や種々のタンパク質合成などに関して, *in vitro* 実験から更なる知見が得られるようになると期待される.

(4) 反応場体積依存性の検証

① 主な成果

GAL 合成では体積に依らず同じタイミングで蛍光値が上昇した. 一方 GUS では, 蛍光値の上昇し始めるタイミングが体積によって大きく異なっていた (図 5). これは, 反応次数の違いに起因する結果であると解釈できる. 即ち, 高次反応は体積依存性であり, 一次反応は非依存性であると考えられる.

一定数の DNA から GUS を合成する場合, 小さい体積のチャンバーでより早く蛍光産

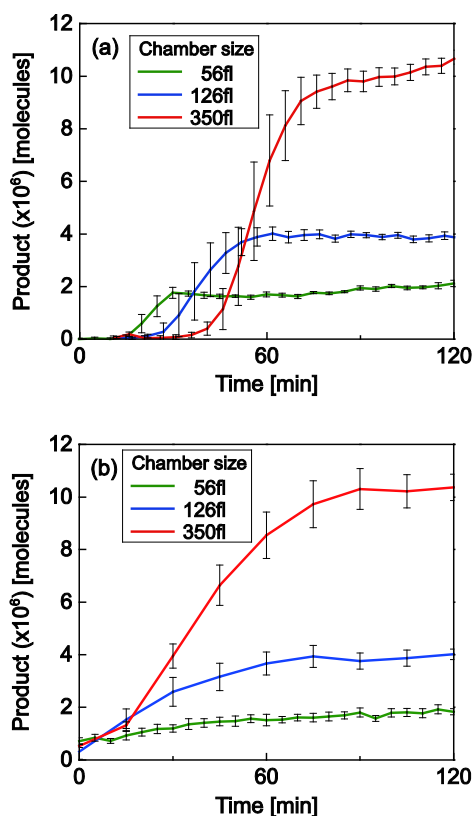


図5 (a) GUS と (b) GAL の合成反応のタイムコース. DNA はチャンパー体積に関わらず平均 70 分子封入されるように濃度調整している. 各データは 50 チャンパーの平均, エラーバーは標準偏差を表している.

物が作られることが分かった. 一方, 封入されている蛍光原基質の濃度は体積に関わらず一定であるため, 基質の分子数はチャンパー体積に比例する. それ故, 小さいチャンパーでは封入された基質が短時間で全て分解され, 反応が他の体積のチャンパーより早く停止した. これらの現象の結果, 高次反応では, 反応産物 (蛍光産物) の収量が最大となる最適なチャンパーサイズが存在することが分かった.

② 国内外におけるインパクトと今後の展望
一定数の DNA を起点としたタンパク質合成の反応場体積依存性を調べるために, 細胞サイズの石英ガラス製マイクロチャンパーを用いて GAL, GUS の合成反応を観察した. その結果, 高次反応である GUS 合成では, 反応産物の収量が最大となる最適な反応場体積が存在することが分かった. 実際の細胞では, 細胞内反応に関わる多くの遺伝子産物が 1 セットの DNA から作られている. 我々の実験系は実際の細胞とは様々な点で異なるが, 細胞の単純化されたモデルとして捉えることはできる. この系を更に発展させることで, 生命の普遍法則を解き明かす一助となることが期待される.

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 2 件)

- ① T. Okano, T. Matsuura, H. Suzuki, and T. Yomo, "Cell-free Protein Synthesis in a Microchamber Revealed the Presence of an Optimum Compartment Volume for High-order Reactions", ACS Synthetic Biology DOI: 10.1021/sb400087e (2013). (査読有)
- ② T. Okano, T. Matsuura, Y. Kazuta, H. Suzuki, and T. Yomo, "Cell-free protein synthesis from a single copy of DNA in a glass microchamber", Lab on a Chip 12, 2704 – 2711 (2012). (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 岡野太治, 松浦友亮, 鈴木宏明, 四方哲也: 「ガラスマイクロチャンパーを用いたタンパク質合成の反応場体積依存性」, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会 (2014.1.11 東北大学片平キャンパスさくらホール)
- ② 岡野太治, 松浦友亮, 鈴木宏明, 四方哲也: 「タンパク質合成反応への反応場サイズの寄与」, 「細胞を創る」研究会 6.0 (2013.11.14 – 15 鶴岡市先端研究産業支援センター)
- ③ 岡野太治, 松浦友亮, 数田恭章, 鈴木宏明, 四方哲也: 「マイクロウェルを用いた DNA 1 分子からのタンパク質合成反応計測」, 日本機械学会 2013 年度年次大会 (2013.9.9 – 11 岡山大学津島キャンパス)
- ④ 岡野太治, 松浦友亮, 数田恭章, 鈴木宏明, 四方哲也: 「マイクロウェルを用いた DNA 1 分子からのタンパク質合成反応計測」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 27 回研究会 (2013.5.23 – 24 東北大学片平キャンパスさくらホール)
- ⑤ 岡野太治, 松浦友亮, 数田恭章, 鈴木宏明, 四方哲也: 「一分子 DNA からのタンパク質合成のリアルタイム計測」, 「細胞を創る」研究会 5.0 (2012.11.21 – 22 東京工業大学すずかけ台キャンパスすずかけホール)
- ⑥ 岡野太治, 松浦友亮, 数田恭章, 鈴木宏明, 四方哲也: 「ガラスマイクロチャンパーを用いた一分子 DNA からのタンパク質合成」, 平成 24 年度電気学会センサ・マイクロマシン部門総合研究会 (2012.6.11 – 12 京都大学百周年時計台記念館)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 太治 (OKANO TAIJI)

大阪大学・情報科学研究科・特別科学研究員

研究者番号: 60622082