【解説】

「超微細生化学反応系」技術の最前線

児島孝明, 中野秀雄

高速DNAシーケンス解析に用いられているエマルジョンPCRが代表例として示されるように、エマルジョン、リボソームやマイクロデバイス技術を利用した極微量空間中 (pL-nL) で細胞培養やさまざまな生化学反応を行う技術に関する研究が近年盛んになってきている。本稿では、これら技術を利用した、新機能タンパク質分子、機能性核酸分子のスクリーニング・創製手法である *in vitro* compartmentalization (IVC) 法、ビーズディスプレイ法を中心とし、転写因子結合配列の網羅的解析技術、リボソームを用いた人工生命系、マイクロ流路デバイスを用いた解析技術など、最近の応用例について解説する。

高速DNAシーケンス解析技術が実用化し、膨大なゲノムデータの蓄積および未知の遺伝子の同定が盛んに行われている。以前では到底不可能と思われていたスループットで大量 (～数百Gb/Run) のDNA配列解析を可能とするこの技術は、従来のDNA解析手法を一新している。その一方で、遺伝子 (DNAもしくはmRNA) からタンパク質を合成する手法としては大腸

菌などの生細胞 (*in vivo*) を利用する手法が依然として主流である。しかしながらこの場合、形質転換効率によるライブラリーサイズの制限や培養ステップの必要性から、寒天プレートを用いるアッセイでは1枚のプレート上でのコロニー数を 10^3 が限度とすると $10^4 \sim 10^5$ 程度、細胞1個ずつでセルソーターなどを用いるアッセイでも形質転換効率に依存するため実質的には $10^7 \sim 10^8$ 程度が限界である。また細胞毒性を有するタンパク質のアッセイができないなどの制約も多い。

それに対し、無細胞 (*in vitro*) タンパク質合成系は、細胞抽出液中に存在するリボソームや翻訳因子、tRNAなどの諸因子の働きにより、DNAあるいはmRNAからその遺伝子産物を生合成させるシステムであり、PCR産物を直接鋳型として短時間に合成でき、また不溶性になりやすいタンパク質、細胞毒性を有するタンパク質、さらに非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成が容易であるなど、タンパク質ライブラリーの構築・スクリーニングには好都合とされる。しかしながら同じ反応スケールで比較すると、コストパフォーマンスが生細胞を用いる系に比べ著しく低いという問題があった。

一方、エマルジョン、リボソームやマイクロデバイス

The Frontline of "Ultra Microscopic Biochemical Reaction Systems"
Takaaki KOJIMA, Hideo NAKANO, 名古屋大学大学院生命農学研究科

技術を利用した極微量空間中 (pL-nL) で細胞培養やさまざまな生化学反応を行う技術に関する研究が近年盛んになってきている。これらを利用し、反応スケールを極微量にすることで、上記の無細胞タンパク質合成系の欠点を補うことができるようになってきた。

本稿では、これらの技術を利用した新機能生体分子のスクリーニング・創製手法として、*in vitro* compartmentalization (IVC) 法、ビーズディスプレイ法、リボソームを用いた人工生命系、マイクロ流路デバイスを用いた超ハイスループットスクリーニング系など、最近の応用例について解説する。

IVC法

Water-in-oil (以下 w/o) エマルジョンは、油相に水相を加え、攪拌することで油相の中に水相の微小粒子を生成させた状態を指す。この際、適切な界面活性剤を適切な濃度で加えることによりエマルジョンを安定化することができ、この技術は食品、化粧品産業など、農芸化学に身近な分野においても広く用いられている。Tawfik と Griffiths は平均数 μm の液滴が形成されるような条件で w/o エマルジョンを作製し、これを無細胞タンパク質合成反応の場として用いる *in vitro* 反応系、IVC 法を考案した⁽¹⁾ (図1)。この際、1分画あたり平均1分子以下となるように希釈した鋳型DNA溶液を無細胞タンパク質合成反応液とともに封入すると、各分画中で鋳型1分子由来の翻訳産物が合成され、遺伝子型と表現型が対応づけられる。現在までにこの手法は、メチラー

ゼ^(1,2)、制限酵素⁽³⁾、DNA結合タンパク質⁽⁴⁾、DNAヌクレアーゼインビヒター⁽⁵⁾、リボザイム⁽⁶⁾などの機能改変に応用されている。

さらに、このIVCの改良版としてw/o/wエマルジョン (double emulsion) を利用したIVC法も開発されている⁽⁷⁾。この手法を用いれば、煩雑なエマルジョン破壊のステップを踏むことなく、分画された状態のまま1秒間に数百から数万ものサンプル解析、分取できるセルソーターによるセレクションが行える。よってこの double emulsion 技術は、さらなる迅速なスクリーニングのみならず、従来のIVC法では困難であった酵素などのスクリーニングを可能にすると考えられている。実際、同研究グループは、この手法を用いて酵素活性 (β -ガラクトシダーゼ活性) の向上に成功している⁽⁸⁾。

また、Doiらはストレプトアビジンとビオチンの結合を利用した STABLE (STA-biotin linkage in emulsions, もしくはDNAディスプレイ) を開発している⁽⁹⁾。この場合、提示したいタンパク質あるいはペプチドをストレプトアビジンとの融合タンパク質としてコードし、かつビオチンラベルした鋳型DNAをIVC同様、1液滴あたり平均1分子以下になるように無細胞タンパク質合成反応液とともに封入する。これにより、各分画中で合成される融合タンパク質はDNAにラベルされているビオチンに結合し、遺伝子型と表現型が直接関連づけられた複合体が形成される。このため、IVC法と異なり、分画を行ったエマルジョンを破壊した後もそのリンクは保持されるのが大きな利点であり、この手法を用いてペプチド⁽⁹⁻¹¹⁾、GST⁽¹²⁾ および抗体Fab⁽¹³⁾ の選択が報告されている。

図1 ■ IVC法の概要

ビーズディスプレイ法

ビーズディスプレイ法とは、鋳型1分子由来のDNAをマイクロビーズ上に固定化することにより得られるビーズライブラリーを用いた各種スクリーニング系の総称を指す。ビーズディスプレイ法は、1) DNAを標的として用いる転写因子結合部位のスクリーニング、2) 固定化されたDNAを鋳型とした無細胞タンパク質合成系を組み合わせた機能性タンパク質のスクリーニング、3) リガーゼ・リボザイムを用いたスクリーニング、に大別される。いずれの手法も粒子状の固相を複合体の足場として用いるその特性により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を行うことが可能である。

1. 転写因子結合部位ハイスループット *in vitro* スクリーニング

細胞内mRNA発現レベルを制御する転写因子はゲノム制御ネットワークを解明する鍵を担っていると言われる。Kojimaらはビーズディスプレイ法を応用して転写因子結合DNA領域の *in vitro* スクリーニング法の確立に成功している⁽¹⁴⁾ (図2)。まずエマルジョンPCRによりDNAライブラリーをビーズライブラリーへと変換し、このライブラリーに対し、ヘキサヒスチジンタグ (Hisタグ) などのエピトープタグと融合させた転写因子を加えて結合反応を行うと、転写因子の結合するDNA配列が存在するビーズ上でのみビーズ-DNA-転写因子複合体が形成される。この際、無細胞タンパク質合

成系によって発現させた転写因子を用いることも可能である。この複合体に蛍光標識された抗タグ抗体を加えると、転写因子の結合しているビーズが蛍光を有することとなる。この蛍光複合体はセルソーターにより迅速に選択分取され、選択された標的DNAをPCRによって回収した後、配列解析を行う。この手法を用いて細菌由来の転写因子^(14, 15) および糸状菌由来の転写因子^(16, 17) の結合配列の選択に成功している。

2. 機能性タンパク質のハイスループット *in vitro* スクリーニング

マイクロビーズ上に固定化されたDNAを鋳型とした無細胞タンパク質合成反応を1分画あたり1ビーズ以下の条件下のエマルジョン中で行うことにより、合成されたタンパク質を同一のビーズ上に固定化し、遺伝子型と表現型とを関連づけることができる。操作の流れは以下のとおりである。まず、ストレプトアビジンでコートされたマイクロビーズに、タンパク質発現に必要なプロモーター、ターミネーター配列を付加し、かつビオチン化したDNAライブラリーを1ビーズあたり平均1分子以下になるように固定し、これをビーズライブラリーとする⁽¹⁸⁾。もしくはエマルジョンPCRによってこれを調製する⁽¹⁹⁾。このライブラリーに抗タグ抗体などのタンパク質の足場を付加した後、無細胞タンパク質合成反応溶液を加え、1分画あたり鋳型ビーズが1個以下となるような条件でエマルジョンを作製し、無細胞タンパク質合成を行う。この際、エピトープタグと融合させた形で

図2 ■ ビーズディスプレイ法を用いた転写因子結合部位スクリーニングの概要

図3 ■ ビーズディスプレイ法を用いた機能性タンパク質スクリーニングの概要

目的タンパク質を発現させることにより、エマルジョン内で抗体を介したビーズ-DNA-タンパク質の複合体が形成され、遺伝子型と表現型が対応づけられる。このビーズ複合体に対して蛍光標識リガンドを加えるなど、用途に応じた適切な蛍光アッセイを組むことにより、セルソーターを用いた陽性クローンの迅速な解析分取が可能となる（図3）。この手法を用いて改変型ホスホリエステラーゼ⁽²⁰⁾、機能性結合ペプチドの選択^(19, 21)や Stapletonらによる [FeFe] ヒドロゲナーゼのスクリーニング系の確立⁽²²⁾が報告されている。また、同一ビーズ上への発現レポーター（GFP）提示量を指標としたプロモータースクリーニング法も開発されている⁽²³⁾。

3. リガーゼ・リボザイムを用いたスクリーニング

リボザイムとはRNA酵素というその名が示すとおり、酵素活性を保持するRNAであり、その一種であるリガーゼ・リボザイムはリガーゼ活性を有する。基質となるRNAへの特異的な連結反応を触媒するこのリガーゼ・リボザイムの性質を利用することにより、ビーズディスプレイ法を新規リボザイムやプロモーターのスクリーニングにも応用することが可能である。Levyらはw/oエマルジョン内 *in vitro* 転写ライゲーション共役反応系を用いて新規の活性型リガーゼ・リボザイムを獲得している⁽²⁴⁾。さらに Wochnerらは油相中の微小液滴内のマイクロビーズ上で転写、ライゲーション共役反応およびプライマー伸張反応を行い、RNA伸張活性を保持するリボザイムをハイスループットに選択する手法

compartmentalized bead-tagging (CBT)を開発し、高い伸張活性と忠実性を保持するリボザイムの獲得に成功している⁽²⁵⁾。また、Kojimaらはリガーゼ・リボザイムをレポーターとして同一ビーズ上への提示量を指標としたプロモータースクリーニング系の開発に成功している⁽²⁶⁾。

リボソームを用いた人工生命系および機能性タンパク質スクリーニング

リボソームとは細胞膜の脂質二重層のように、内部水相をリン脂質によって分画化された小胞である。このリボソームに任意のDNAやタンパク質を封入することができることから、医療分野における薬物伝達などに広く用いられている。このリボソームのサイズを一般的な細胞のサイズに合わせて調製したリボソームはジャイアント・リボソームと呼ばれる。このジャイアント・リボソーム中に無細胞タンパク質合成反応溶液を封入することにより、一種の疑似細胞中で任意のタンパク質を合成することができる。実際、活性型での発現が一般的に困難とされる膜タンパク質を含むさまざまなタンパク質の合成がジャイアント・リボソーム内で可能である^(27, 28)。さらに好熱性 *Bacillus* PS3 由来のF₀F₁-ATP合成酵素複合体をリボソーム上に *in vitro* でかつ活性型で発現できることが示されている⁽²⁹⁾。エネルギー生産能をリボソームに付与できるということから、人工生命系の確立がいつそう現実味を帯びてきたと言えるだろう。

また、IVC法同様に無細胞タンパク質合成反応溶液と

鋳型DNAを1分画あたり平均1分子以下の条件でこのジャイアント・リポソームとして封入することにより、各小胞中で鋳型1分子由来の翻訳産物が合成され、遺伝子型と表現型が対応づけられる(図4)。油相中で分画を行うIVC法とは異なり、外液が水相であるため、その分画を維持したまま発現、酵素反応、およびセルソー

ターによるスクリーニングを行える点がこの手法の大きな特徴であり、実際、この手法を用いてYomoらの研究グループは、より高い蛍光強度を有するGFPの選択⁽³⁰⁾やGUSのスクリーニング⁽³¹⁾に成功している。また従来のIVC法では困難とされた膜タンパク質を標的としたスクリーニング系を組むことも可能であり、膜タンパク

図4 ■ リポソームを用いた機能性タンパク質スクリーニングの概要

図5 ■ マイクロ流路デバイスを用いた機能性タンパク質スクリーニングの概要

質の一種 α -ヘモリシンの透過活性を指標としたスクリーニング⁽³²⁾ も報告されている。

マイクロ流路デバイスを用いたスクリーニング系

微細加工技術により作製された微小流路中でさまざまな生化学反応を行うマイクロ流路デバイスは、反応スケールの低減および自動化による操作の簡便化が可能である。これらに加え、エマルジョン調製に用いる場合、攪拌などの従来の手法に比べより均一な液滴が作製できる、液滴融合によって一度調製した液滴に新たな試薬を加えることが可能といった利点も有する。Griffithsらの研究グループは、このマイクロ流路デバイス上で蛍光による解析および分取を行う新たなスクリーニングシステムである、microfluidic fluorescence-activated droplet sorter (FADS) を提唱し⁽³³⁾、マイクロ流路デバイスで作製した液滴中で無細胞タンパク質合成系を行い、蛍光による解析が可能であることを示した⁽³⁴⁾。さらに同グループは、この技術を応用し、エマルジョンPCRおよびエマルジョン内無細胞タンパク質合成系に用いる各エマルジョンの調製、陽性液滴の蛍光による解析、分取の各手順をマイクロ流路デバイス上でハイスループットに行う技術を確立している⁽³⁵⁾ (図5)。

おわりに

TawfikとGriffithsによってIVC法が考案された1998年以降、本稿で取り上げたような微小な *in vitro* 生化学反応系を用いたスクリーニング手法は飛躍的に進展してきた。これらの手法は、従来の生細胞を用いた系では困難とされたM (メガ) からG (ギガ) オーダーのライブラリー処理を短時間で可能とする。無論、*in vitro* でライブラリーの選抜を行うというその性質上、これらの系によって獲得された陽性クローンは、最終的に生細胞内での評価が必要となる場合も多い。しかしながら、その高いスループット性と汎用性の高さは非常に魅力的であり、本農芸化学分野において今後も多大な貢献をしていることは疑いないであろう。

文献

- 1) D. S. Tawfik & A. D. Griffiths: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 652 (1998).
- 2) H. M. Cohen, D. S. Tawfik & A. D. Griffiths: *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 3 (2004).
- 3) N. Doi, S. Kumadaki, Y. Oishi, N. Matsumura & H. Yanagawa: *Nucleic Acids Res.*, **32**, e95 (2004).
- 4) A. Sepp & Y. Choo: *J. Mol. Biol.*, **354**, 212 (2005).
- 5) K. Bernath, S. Magdassi & D. S. Tawfik: *J. Mol. Biol.*, **345**, 1015 (2005).
- 6) J. J. Agresti, B. T. Kelly, A. Jaschke & A. D. Griffiths: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16170 (2005).
- 7) K. Bernath, M. Hai, E. Mastrobattista, A. D. Griffiths, S. Magdassi & D. S. Tawfik: *Anal. Biochem.*, **325**, 151 (2004).
- 8) E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly & A. D. Griffiths: *Chem. Biol.*, **12**, 1291 (2005).
- 9) N. Doi & H. Yanagawa: *FEBS Lett.*, **457**, 227 (1999).
- 10) M. Yonezawa, N. Doi, Y. Kawahashi, T. Higashinakagawa & H. Yanagawa: *Nucleic Acids Res.*, **31**, e118 (2003).
- 11) N. Doi, N. Yamakawa, H. Matsumoto, Y. Yamamoto, T. Nagano, N. Matsumura, K. Horisawa & H. Yanagawa: *PLoS One*, **7**, e30084 (2012).
- 12) M. Yonezawa, N. Doi, T. Higashinakagawa & H. Yanagawa: *J. Biochem.*, **135**, 285 (2004).
- 13) T. Sumida, N. Doi & H. Yanagawa: *Nucleic Acids Res.*, **37**, e147 (2009).
- 14) T. Kojima, Y. Takei, M. Ohtsuka, Y. Kawarasaki, T. Yamane & H. Nakano: *Nucleic Acids Res.*, **33**, e150 (2005).
- 15) T. Kojima, T. Yamane & H. Nakano: *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 440 (2006).
- 16) T. Kojima, Y. Hashimoto, M. Kato, T. Kobayashi & H. Nakano: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 519 (2010).
- 17) P. Wang, T. Kojima, T. Kobayashi & H. Nakano: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1128 (2012).
- 18) A. Sepp, D. S. Tawfik & A. D. Griffiths: *FEBS Lett.*, **532**, 455 (2002).
- 19) R. Gan, Y. Yamanaka, T. Kojima & H. Nakano: *Biotechnol. Prog.*, **24**, 1107 (2008).
- 20) A. D. Griffiths & D. S. Tawfik: *EMBO J.*, **22**, 24 (2003).
- 21) R. Gan, S. Furuzawa, T. Kojima, K. Kanie, R. Kato, M. Okochi, H. Honda & H. Nakano: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 411 (2010).
- 22) J. A. Stapleton & J. R. Swartz: *PLoS One*, **5**, e15275 (2010).
- 23) S. Paul, A. Stang, K. Lennartz, M. Tenbusch & K. Überla: *Nucleic Acids Res.*, **41**, e29 (2013).
- 24) M. Levy, K. E. Griswold & A. D. Ellington: *RNA*, **11**, 1555 (2005).
- 25) A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson & P. Holliger: *Science*, **332**, 209 (2011).
- 26) T. Kojima, S. Ohuchi, Y. Ito & H. Nakano: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 671 (2012).
- 27) Y. Kuruma, P. Stano, T. Ueda & P. L. Luisi: *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 567 (2009).
- 28) P. Stano, P. Carrara, Y. Kuruma, T. P. de Souza & P. L. Luisi: *J. Mater. Chem.*, **21**, 18887 (2011).
- 29) Y. Kuruma, T. Suzuki, S. Ono, M. Yoshida & T. Ueda: *Biochem. J.*, **442**, 631 (2012).
- 30) T. Sunami, K. Sato, T. Matsuura, K. Tsukada, I. Urabe & T. Yomo: *Anal. Biochem.*, **357**, 128 (2006).
- 31) T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, N. Ichihashi & T.

- Yomo : *Anal. Chem.*, **84**, 5017 (2012).
- 32) S. Fujii, T. Matsuura, T. Sunami, Y. Kazuta & T. Yomo : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16796 (2013).
- 33) J. C. Baret, O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti *et al.* : *Lab Chip.*, **9**, 1850 (2009).
- 34) L. Mazutis, J. C. Baret, P. Treacy, Y. Skhiri, A. F. Araghi, M. Ryckelynck, V. Taly & A. D. Griffiths : *Lab Chip.*, **9**, 2902 (2009).
- 35) A. Fallah-Araghi, J. C. Baret, M. Ryckelynck & A. D. Griffiths : *Lab Chip.*, **12**, 882 (2012).

プロフィール

児島 孝明 (Takaaki KOJIMA)

＜略歴＞2006年名古屋大学大学院生命農学研究科博士課程後期修了，博士(農学)／同年大阪府立大学理学系研究科研究補助員／2007年同大学理学系研究科非常勤研究員／2008年名古屋大学大学院生命農学研究科助教＜研究テーマと抱負＞DNAのビーズディスプレイ法を用いた生体分子間相互作用検出法の開発と応用に関する研究を中心に行っている．この手法を駆使してプロモーター領域のエンジニアリングを行い，バイオプロセスデザインに応用することを目指している＜趣味＞読書，歴史探訪

中野 秀雄 (Hideo NAKANO)

＜略歴＞1991年東京大学大学院工学系研究科化学工学専攻博士課程単位取得後退学／同年名古屋大学農学部食品工業化学科助手／1992年 博士(工学)／1995年名古屋大学農学部食品工業化学科助教授／2005年同大学大学院生命農学研究科教授＜研究テーマと抱負＞タンパク質工学，抗体工学および関連する新技術の開発＜趣味＞テニス