



平成 28 年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】

ゲルビーズ懸濁型タンパク質スクリーニングシステムの原理実証

【整理番号】

TK16-69

【代表機関】

筑波大学

【調査研究代表者(氏名、連絡先 TEL & Mail)】

市川 創作、029-853-4627、ichikawa.sosaku.fn@u.tsukuba.ac.jp

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

産業技術総合研究所：杉浦 慎治

【TIA 外連携機関】

該当なし

【報告書作成者】

杉浦 慎治・市川 創作

【報告書作成年月日】

2017 年 4 月 7 日

【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

本課題の連携機関で共同開発した基礎技術のフィージビリティスタディを、緊密な連携のもとで推進した。

具体的には、筑波大学の学生を産業技術総合研究所の技術研修生として派遣すると共に、筑波大学と産業技術総合研究所の双方でフィージビリティスタディを主に実験的に進めた。研究担当者は、2週間から3週間に一回、定期的なミーティングを行い、研究結果について報告すると共に、研究の手法や方針について議論を重ねた。また、研究の進展や連携の強化を図るため、筑波大学と産業技術総合研究所の双方に於いて、本課題の研究者担当以外の研究者や大学院生に対して研究成果を発表し、広く意見やアドバイスを求め研究推進に反映した。

本研究で得られた成果は、TIA 関連機関からの参加が多い「平成 28 年度つくば学生研究交流会」、ならびに「nano tech 2017 国際ナノテクノロジー総合展」に於いて発表し、連携機関の拡大に努めた。

【調査研究内容(実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果)】

DNA ライブラリから個別にタンパク質を合成し、その活性を比較することで高活性タンパク質を取得する分子進化工学的手法には膨大な並列反応数が必要である。我々の研究グループでは、並列反応数の大きいアガロースゲルビーズを用いた持つ懸濁型マイクロバイロリアクションシステムを開発している(特願 2016-27804)。しかしながら、本システムは緑色蛍光タンパク質(GFP)を使用した検証が行われたのみで、多様な遺伝子の発現が必要な分子進化工学的スクリーニングへの利用

は検討されていない。本研究では GFP と赤色蛍光タンパク質 (mStrawberry) との二種の蛍光タンパク質をモデルとしたタンパク質スクリーニング系の構築を行った。

産総研においては、マイクロ流路を用いた平均粒径 41 μm の粒径の均一なゲルビーズの作製を行った (図 1)。

筑波大学においては、mStrawberry をコードする DNA と GFP をコードする DNA とを共通のプライマーによって増幅するようにテンプレート DNA を作製し、増幅後に無細胞タンパク質合成を行った。タンパク質合成反応液を油相中に分散した結果、mStrawberry の赤色の蛍光が観察され (図 2)、本システムで利用したテンプレート及び共通プライマーが正常に機能することが確認された。また、本研究で使用する共通プライマーを修飾したポリスチレン基材の微粒子 (直径 0.5 μm) と mStrawberry をコードしたテンプレート DNA を混合して PCR を行った。SYBRGreen の蛍光から微粒子周辺に DNA が局在していることが観察された (図 3)。この結果から増幅した DNA は修飾微粒子に捕捉されたと考えられる。

以上の成果をつくば学生研究交流会、ナノテク展で発表し、企業連携に向けた成果発信を行った。

【今後の予定】

以上の結果より、本研究で作製した mStrawberry をコードしたテンプレート DNA および、共通プライマーを固定した微粒子が PCR による増幅とタンパク質発現に有用であることが確認された。今後は、懸濁型マイクロバイオリアクションシステムを用いて mStrawberry と GFP を同時に発現させ、複数の遺伝子からのタンパク質スクリーニング系を構築していく予定である。

さらに、モデルスクリーニング系による実証実験のデータをエビデンスとして企業共同研究へと展開する。具体的な用途として産業用酵素を想定し、産業用酵素の開発や製造・販売を行っている企業に対して本技術の利用を働きかける。また、阻害剤、シグナル伝達物質といった生理活性タンパク質のスクリーニングへの応用へ向け、製薬企業に対しても本技術を紹介し、利用を働きかける。本技術の広報は、学会発表や技術展示会への出展などによりを行うと共に、各機関の産学連携課のサポートも得ながら、関連企業に対しても積極的に行う。企業との共同研究は用途毎に個別に行い、様々な用途への展開を同時に進める。

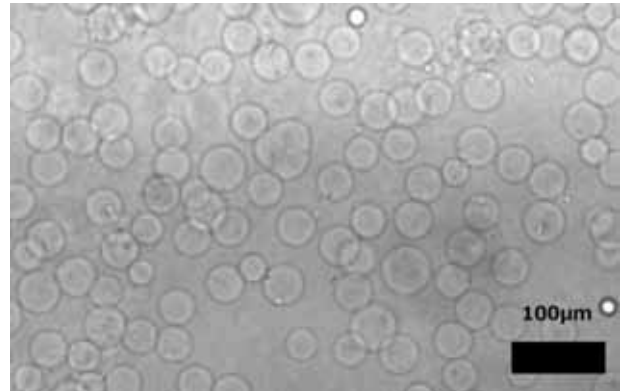


図 1 . マイクロ流路を用いて作製したゲルビーズ .

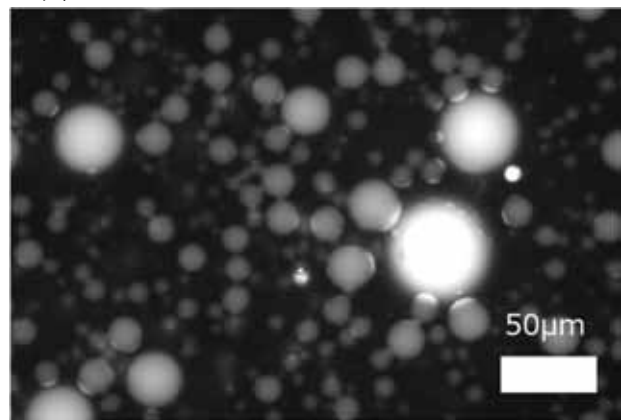


図 2 . タンパク質合成反応液を輸送中に懸濁させて観察された mStrawberry 由来の赤色蛍光 .

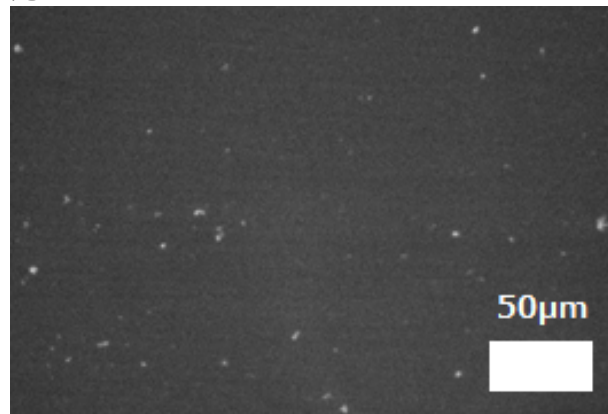


図 3 . 微粒子に固定化した共通プライマーを用いた DNA 増幅によって観察された微粒子表面の蛍光 .

以上