

マイクロ液滴を利用した有用な機能性生体分子の探索・創製

研究代表者

船津高志 東京大学大学院薬学系研究科 教授

共同研究者

庄子習一 早稲田大学理工学術院 教授



1. 研究の背景と達成目標

油の中に分散した体積数ピコリットルの水滴（以下、マイクロ液滴と呼ぶ）を独立した試験管として利用することにより、生体分子の大規模スクリーニングを行う技術を確認する。これにより創薬やバイオマス資源の利用を効率化し、産業の発展に貢献することを目的とした。詳細は以下のとおりである。

① バイオマス分解酵素遺伝子の取得

循環型社会へ転換するため、植物・海藻バイオマスに大きな関心が寄せられている。マイクロ流体デバイスを用いて、環境中の 10^6 個のバクテリアを基質となるバイオマスとともに一細胞単位で液滴に封入する。液滴内で微生物が分泌する酵素によりバイオマスが分解されると液滴の粘弾性が増大する。このような液滴を回収し、内包される微生物のゲノム情報からバイオマス分解酵素遺伝子を取得する。

② GPCR に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストの取得

GPCR は重要な創薬標的であり、現在上市されている医薬品の約半数が、これを標的としている。マイクロ流体デバイスを用いて、ペプチドをコードするライブラリー-DNA (10^9 個のペプチドライブラリー)、無細胞タンパク質合成系、標的 GPCR を発現する出芽酵母を液滴に封入する。活性が認められた液滴から DNA を回収し、GPCR に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストを取得する。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

油の中に分散した直径 $20\mu\text{m}$ 、体積 4pL の水滴を独立した試験管として利用し、「未利用バイオマスを分解する酵素」および「G タンパク質型共役受容体 (GPCR) に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニスト」を取得することを可能にした。詳細は以下のとおりである。

① バイオマス分解酵素遺伝子の取得

環境中の 99 %以上の微生物は、現在の技術では培養が不可能あるいは困難な微生物とされている。これらの微生物のゲノム解析は、産業上有用な酵素遺伝子の取得に繋がると期待される。本研究では、試料中の微生物を 1 細胞単位で W/O 型の液滴へと封入し、標的とする酵素の活性を液滴内で測定し、標的酵素を発現している微生物を選択的に回収し、ゲノム解析を行った。これにより、培養を介さずに環境中の微生物から所望する酵素活性を有する遺伝子を得ることを可能とした。

② GPCR に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストの取得

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は、酵母からヒトに至る真核生物に存在する 7 回膜貫通型受容体の一種である。GPCR は細胞外からの神経伝達や細胞増殖などの様々なシグナルを受容し、細胞内へ伝える役割を持つことから、多くの治療薬がこれを標的としている。現在も新薬候補となるリガンドの探索が精力的に行われているが、化合物ライブラリーと既存のリガンドアッセイ系を用いた探索では、同定されうる組み合わせは出尽くしたと言われている。そこで本研究では、Water-in-Oil (W/O) 型の液滴内で 1 種類の遺伝子型とそれに対応する表現型を共存させる手法を用いて、出芽酵母を利用した、GPCR に作用するペプチドアゴニストの効率的な創生システムを開発した。

3. 研究成果

① バイオマス分解酵素遺伝子の取得

多くのバイオマスは有機高分子でできている。これが分解されると粘弾性が変化することを利用して、バイオマス分解酵素遺伝子を取得できることを示した。具体的には、アガロースとアガロース分解酵素を含む液滴を調製したところ、分解反応が進むにつれて粘弾性が低下し、ソーティングデバイスで回収することができた(図1)。このデバイスで 10^6 個の液滴を分離することが可能である。これにより、未利用バイオマス(セルロース、リグニン、海藻多糖類など)を効率良く分解する酵素の遺伝子を取得するための方法を確立できた。

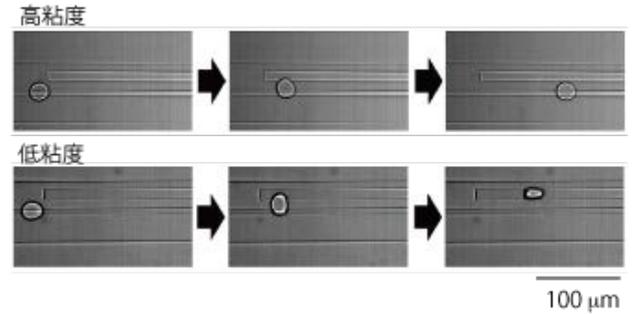


図1：液滴を、大きさの異なる2本のレールにまたがるように流す。粘性が高いとそのまま流れ(上図)、粘性が低いと変形して細いレール(上部)へ移動する

② GPCR に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストの取得

液滴を用いたペプチド創出システムの概略を図2に示す。 10^9 個のペプチドスクリーニングを可能とする DNA ライブラリーを作製し、磁気ビーズ1つあたり1~数百種類の DNA を約3万分子提示した。このビーズと標的 GPCR を発現する出芽酵母を液滴に閉じ込め、リガンド合成と活性評価を行った。GPCR が活性化すると出芽酵母が緑色蛍光タンパク質を合成するように工夫することにより、標的ポリペプチドとそれをコードする DNA を含む液滴を検出することができた。これをマイクロ流路チップ・セルソーター(On-chip Sort)を用いて回収することができた。

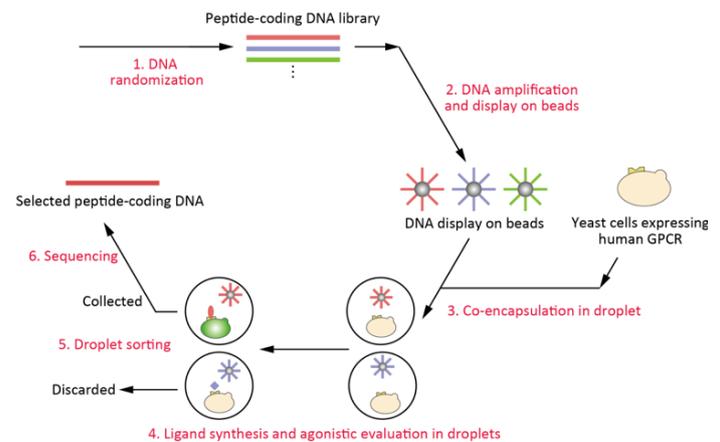


図2：液滴を用いたペプチド創出システム

4. 今後の展開

① バイオマス分解酵素遺伝子の取得

本研究により、培養を介さずに環境中の微生物から有用な酵素を取得できると期待される。バイオマスの分解にとどまらず、プラスチック分解酵素の取得にも応用可能であり、エネルギー問題や環境問題の解決に貢献するだろう。本手法は、天然の酵素をスクリーニングするだけでなく、これらに突然変異を加えて更に性能の良くなった酵素分子を創生する進化分子工学へも展開可能である。

② GPCR に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストの取得

本研究により、疾患に関連する GPCR のペプチドアゴニスト・アンタゴニストの作製が加速されると期待される。また、同様の手法で内因性のリガンドが同定されていない GPCR (オーファン GPCR) に対するペプチドアゴニスト・アンタゴニストを創製すれば、オーファン GPCR の機能を解明するための重要な手がかりとなり、医学、生命科学研究へ貢献するだろう。

5. 発表実績

- ・船津高志「核酸・蛋白質をマイクロ・ナノデバイスで分析する」、2018年5月26日~27日、第78回分析化学討論会、山口大学常盤キャンパス、宇部市、山口県(招待講演)
- ・船津高志「一分子蛍光イメージング法による生命機能の解明」2018年6月1日、超分子研究会、中央大学後楽園キャンパス、文京区、東京都(招待講演)