報告番号	※　　第　　号

主　論　文　の　要　旨

論文題目　Establishment of biochemical high-throughput screening systems in microfluidic emulsion
マイクロフルイディックエマルジョン中でのハイスループット生化学反応スクリーニングシステムの開発

氏　　名　MURZABAEV Marsel

論　文　内　容　の　要　旨

無細胞タンパク質合成系に代表される *in vitro* 反応系は、従来の生細胞を用いる系に比べて、迅速かつ簡便に生体分子ライブラリーの構築・スクリーニングを行うことができる。しかしながら、一般に反応あたりのコストが生細胞の系に比べ著しく高く、大規模スクリーニングには不向きとされている。この為、*in vitro* 反応系の 1 サンプルあたりの反応スケールを下げることによってスクリーニングの低コスト化を可能とする、エマルジョン、リポソームやマイクロデバイス技術を利用した微小スケールでの *in vitro* 反応系が考案されている。

第 2 章では流体力学的な液滴作製技術の一種、フローフォーカシング技術を応用した均一なエマルジョン液滴を簡便に調製法について述べる。このデバイスは特別な装置を必要とせず、市販の部品のみで構築可能である。ジェットタイプ、キャピラリータイプ、2 種類のデバイスを設計し、これらを用いて W/O エマルジョン液滴を作製したところ、ボルテックスミキサーを用いた従来のエマルジョン液滴調製法に比べ、いずれのタイプにおいても極めて均一な液滴調製が迅速に調製できることが示された。

第 3 章では、上記デバイスを兒島らによって以前報告されたリガーゼ活性を保持するリボザイムとエマルジョン液滴を用いた *in vitro* 転写活性解析法に応用した。このデバイスによって調製されたエマルジョン液滴中でリガーゼリボザイム、bcI-23 は T7 RNA ポリメラーゼ/プロモーターによる *in vitro* 転写反応によって発現され、基質 RNA を介して同一ビーズ上に固定化される。このビーズに対して蛍光標識プライマーを用いた逆転写反応によって蛍光標識を施し、転写活性をフローサイトメトリーによって解析したところ、ボルテックスミキサーを用いた場合に比べ、低い CV 値が得られた。

第 4 章では、上記デバイスの W/O エマルジョン中無細胞タンパク質合成系への応用について述べる。ラムダファージ由来の転写因子 Cro 二量体をリンカーによって融

合された single chain Cro (scCro)はその結合コンセンサス配列 O_R consensus DNA (ORC)と非常に強固な複合体を形成する。この scCro 遺伝子をプロモーター、ターミネターを保持する鋳型 DNA としてマイクロビーズ上に固定化し、無細胞タンパク質反応溶液とともにこのデバイスを用いて W/O エマルジョン液滴に封入した。エマルジョン液滴中で scCro が発現し、発現した scCro は ORC をあらかじめ固定化した自身のマイクロビーズ上に固定化される。このビーズ複合体を回収し、scCro 固定化量をフローサイトメトリーによって解析したところ、*in vitro* 転写活性解析同様、ボルテックスミキサーを用いた場合に比べ、CV 値の改善が確認された。

第 5 章では、W/O エマルジョン液滴の状態で目的液滴を迅速に分離できる On-chip Sort (On-chip 社)を用いたプロモータースクリーニング系構築について述べる。プロモーターを保持する GFP 遺伝子と保持しない GFP 遺伝子をマイクロビーズ上に固定化し、これらを 1:100 で混合したモデルビーズライブラリーを調製し、W/O エマルジョンに封入した。無細胞タンパク質合成反応後、On-chip Sort によって蛍光を保持する液滴を回収したところ、わずか 1 ラウンドでプロモーターを保持する DNA の優位な濃縮が確認された。この結果から、無細胞タンパク質合成系及び On-chip Sort を用いた本手法が迅速なプロモータースクリーニングに大きな力を発揮することが示された。