

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 MURZABAEV Marsel

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)

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	中 野 秀 雄
委 員	名古屋大学教授	本 多 裕 之
委 員	名古屋大学教授	北 島 健
委 員	名古屋大学准教授	岩 崎 雄 吾
委 員	名古屋大学助教	兒 島 孝 明
委 員	名古屋大学助教	Jasmina Damnjanovic

論文審査の結果の要旨

MURZABAEV Marselは、マイクロフルイディックデバイスを用いたエマルジョン調製技術を開発し、これを用いた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を目指した研究を行った。以下に論文審査の要旨を示す。

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の調製法の開発

無細胞タンパク質合成系に代表される *in vitro* 反応系は、生体分子ライブラリーの迅速な構築とスクリーニングを可能とする反面、反応あたりのコストが生細胞の系に比べ著しく高い。この解決策として、スクリーニングの低コスト化、高集積化を目的として、W/O エマルジョン液滴を用いた微小スケールの *in vitro* 反応系がこれまでに考案されている。しかしながら、攪拌機を用いた従来のエマルジョン調製法では均一な液滴形成が困難である為、均一なライブラリーを構築する上でこれは大きな障害であった。そこで MURZABAEV Marsel 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、均一なエマルジョン液滴の簡便に調製を可能とするジェットタイプ、キャピラリータイプ、2種類のデバイスの構築を行った。これら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。上記2種類のデバイスを用いて W/O エマルジョン液滴を作製したところ、攪拌機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。

次に MURZABAEV Marsel は、上記キャピラリータイプ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。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 プロモーターを認識した T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応によって発現し、ピオチン化基質 RNA、S-bcI 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、攪拌機を用いた場合の Robust CV 値が 39 を示したのに対し、デバイスを用いた場合は 29.7 であった。

さらに MURZABAEV Marsel は、上記ジェットタイプデバイスを W/O エマルジョン中無細胞タンパク質合成系への応用を試みた。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 OR consensus DNA (ORC) と非常に強固な複合体を形成することが以前の報告から明らかとなっている。この scCro 遺伝子を T7 プロモーター、SD 配列および T7 ターミネー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ジェットタイプデバイスを用いて W/O エマルジョン液滴に封入した。調製されたエマルジョン液滴中の無細胞タンパク質合成により 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、攪拌機を用いた場合の Robust CV 値が 59.4 だったのに対し、デバイスを用いた場合 42.3 であった。以上の結果から、本デバイスが均一な微小 *in vitro* 生化学反応系の構築に大きな力を発揮することが示された。また MURZABAEV Marsel は、プロモータースクリーニングに用いる RNA ポリメラーゼの調製、活性測定を行った。イネクロプラスト由来 RNA ポリメラーゼ RpoTp を大腸菌を用いて発現、精製を行い、植物由来の種々のプロモーターを用いてその活性の評価を試みた。しかしながら、その特異的な活性は確認できなかった。一方、T7RNA ポリメラーゼ変異体 Q758C の T7 プロモーターに対する転写活性を bcl-23 を用いた *in vitro* 転写活性解析法によって評価したところ、T7RNA ポリメラーゼ野生型を用いた場合に比べてやや低いものの、その活性が検出された。今後、これらの RNA ポリメラーゼの再調製、反応条件の最適化を行い、本デバイスを用いたプロモータースクリーニングを実施することで、新規プロモーターの獲得が期待される。

W/O エマルジョン液滴分取装置を用いた新規プロモータースクリーニング法の構築

次に、MURZABAEV Marsel は、W/O エマルジョン液滴の状態での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を試みた。プロモーターを保持する Superfolder Green Fluorescent Protein (sfGFP) 遺伝子と保持しない sfGFP 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、ジェットタイプデバイスを用いて 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 300000 液滴を解析し、そのうち蛍光を保持する液滴 275 個を回収した。この分取された液滴を蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、全ての液滴において優位な GFP 蛍光シグナルが観察された。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。

以上のように MURZABAEV Marsel は本研究において、1) 微小生化学反応系を目的とした均一なエマルジョン液滴の調製法の開発に成功した。2) W/O エマルジョン液滴分取装置、On-chip Sort を用いたプロモータースクリーニング系の有用性を示した。

本研究によって得られた成果は、今後の核酸、タンパク質をターゲットとしたハイスループット生化学反応スクリーニングおよびその応用技術に寄与するところが多い。よって本委員会は本論文が博士(農学)の学論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。