

超微細生化学反応系とバイオインフォマティクスを用いた 機能性生体高分子の探索技術の開発

名古屋大学大学院生命農学研究科 講師 児島 孝 明

はじめに

核酸、タンパク質に代表される機能性生体高分子は、様々な生命現象に深く関与している。このため、結合性や酵素活性などを指標とした生体高分子の大規模スクリーニング系の構築は、生命機構の解明のみならず、自然界にはない新規機能性分子を創出する上で非常に重要である。しかしながら、このスクリーニングには膨大な分子ライブラリーや取得データの迅速かつ網羅的な解析が必要であり、これらは大腸菌などを用いた従来の手法ではなかなか容易なことではない。筆者らはこれまでに、機能性生体高分子のハイスループット探索を目的とした様々な解析法の構築を行ってきた。以下にその概要を紹介する。

1. 機能性核酸のハイスループットスクリーニング法

エマルジョン PCR は、マイクロビーズに固定化したプライマーを用いて pL スケールの極微細空間の W/O エマルジョン液滴中で DNA 分子を鋳型とした PCR を行い、DNA ライブラリーをマイクロビーズ上に構築する技術である。ビーズディスプレイ法はこの“ビーズライブラリー”を用いた機能性生体高分子のスクリーニング系の総称である。

一方、DNA 結合型転写因子（以下、転写因子）は、標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御することで生体内の様々な機能に深く関与している。このため、生命現象の理解には、転写因子の結合 DNA の網羅的な同定が重要となる。

筆者らは、上記ビーズディスプレイ法を用いた DNA-転写因子相互作用解析法を確立し、これまでに種々の転写因子の

DNA 結合配列の解析を行ってきた（図1）。具体的には、メタノール資化性細菌 *Paracoccus denitrificans* 由来の転写因子 PhaR の結合配列の解析を行い、新規 PhaR 結合配列を獲得した。さらに、ランダム DNA ライブラリーを用いて糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の転写因子 AmyR の結合 DNA 配列の解析を行い、CGGN₈CGG とされていた AmyR 結合 DNA モチーフのうち、N₈領域には T が優先的に保存されることを明らかにした。

また、エマルジョン PCR によってビーズ上に提示された DNA は、W/O エマルジョン液滴中で無細胞転写反応の鋳型として用いることができる。筆者らは、RNA リガーゼ活性を保持するリボザイムをレポーターとし、転写されたリボザイムが自身の活性によって同一ビーズ上に提示されることを利用して、活性型プロモーターの新規スクリーニング法を考案した。

2. 機能性ペプチド、タンパク質のハイスループットスクリーニング法

ビーズディスプレイ法は、無細胞タンパク質合成系を組み合わせることで、遺伝子型（DNA）と表現型（ペプチド、タンパク質）をマイクロビーズ上で対応付けすることができる。筆者らはこの手法を用いてこれまでに、機能性ペプチド（ポリヒスチジンタグ結合性ペプチド、アンジオテンシン II 結合性ペプチド）、酵素（HRP）のハイスループットスクリーニング法を報告した。また、無細胞タンパク質合成系による白色腐朽菌由来マンガンペルオキシダーゼ（MnP）の発現条件を最適化し、DNA リガンドと強固な複合体を形成する DNA 結合タンパク質 scCro を用いて MnP やトランスグルタミナーゼ（TG）をビーズ上により安定に提示する手法を確立した。また近年、筆者らはこの scCro とその変異体（scCroM）を分子ツールとして用い、各結合配列を組み込んだ DNA スキャフォールド上で目的タンパク質を任意の部位に配置する手法を考案した。この手法を用いて筆者らは、マイクロビーズに固定化した DNA 上に TG およびその基質を空間的近傍に配置し、酵素反応を分子レベルで解析するアッセイシステムを構築した。

さらに筆者らは、酵母細胞を用いた種々のスクリーニング法を開発している。具体的には、酵母エマルジョン培養法を確立し、ランダムシグナルペプチドライブラリーよりカビ由来 β -ガラクトシダーゼ LacA を分泌するペプチド配列を獲得した。また、酵母由来シグナルペプチドライブラリーより目的タンパク質に最適なシグナルペプチドを選択する手法、Signal peptide optimization tool (SPOT) を構築し、AGA2 シグナル配列等が LacA の分泌生産に適することを示した。さらに、Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) 法を酵母細胞に適用させたタンパク質間相互作用スクリーニング法を構築している。

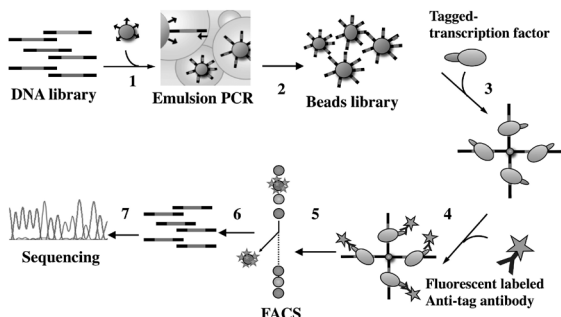


図1. ビーズディスプレイ法による転写因子の結合部位スクリーニングの概略 (Kojima et al. JBB 2010 doi:10.1016/j.jbiosc.2009.11.024)

1) エマルジョン PCR による DNA ライブラリーからビーズライブラリーへの変換 2) W/O エマルジョンの破壊とビーズライブラリーの回収 3) エピトプタグを有する転写因子の添加とビーズ複合体の形成 4) 蛍光標識抗タグ抗体によるビーズ複合体の標識 5) セルソーターによる蛍光標識ビーズ複合体の選別 6) PCR による選択ビーズからの DNA の回収 7) 選択 DNA のシーケンス解析

3. エマルジョン液滴ハイスループット調製法

W/O エマルジョン液滴は、スクリーニングの低コスト化とライブラリーサイズの増大を見込むことができ、種々の *in vitro* 反応系の場としてかねてより汎用されている。しかしながら、攪拌機を用いた従来の W/O エマルジョン液滴調製法では、均一なサイズの液滴形成が困難であり、これは均質なライブラリーを構築する上で大きな問題であった。筆者らは、液滴作製技術の一種、フローフォーカシング (FF) 法を応用した均一なエマルジョン液滴の迅速かつ簡便な調製法を開発した。この方法を細胞のハイスループット分画に応用し、高速 DNA シークエンシング及びバイオインフォマティクス解析を組み合わせることで、1細胞由来の H鎖-L鎖のペアリングの網羅的解析法を確立した。さらにこのエマルジョン液滴調製法をビーズディスプレイ法に適用し、より均一な分子ライブラリーをビーズ上に構築できることを示した。

4. 抗体の新規作製技術の開発

単一の抗体産生細胞に由来するモノクローナル抗体は、標的抗原に対して高い特異的結合性を示す。この特性から、研究現場のみならず、診断・医薬分野などでも様々な形で利用されている。

筆者らは、このモノクローナル抗体の新規取得や高機能化を目的とした種々の研究アプローチを展開してきた。具体的には、1細胞を鋳型とした RT-PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた迅速なモノクローナル抗体作製法を開発し、食中毒菌に対するウサギモノクローナル抗体を獲得した。さらに、この手法によって取得した抗体にロイシンジッパーペプチドを付加することで、活性型 Fab を高効率で発現させるシステムを構築した。また、IgG と IgA の両方の機能を併せ持つキメラ抗体の作製法を開発し、新規抗 HER2 IgG/IgA キメラ抗体を取得した。これらに加えて近年、著者らはモノクローナル抗体を用いた超高感度免疫アッセイシステムや抗体-酵素融合タンパク質発現系を構築した。

5. バイオインフォマティクスを用いた転写制御機構の解析

上述のように、転写因子は様々な生体内反応機構に深く関与しており、これらの機構を包括的に理解するためには、発現制御される遺伝子をゲノムワイドで解析・同定することが必要である。筆者らは高速 DNA シークエンシング技術とバイオインフォマティクス解析を組み合わせた転写制御機構のゲノムワイド解析システムを構築した (図2)。このシステムでは、*in vitro* で目的転写因子に結合するゲノム中の領域を選択濃縮する gSELEX-Seq と、生細胞中で転写因子によって発現制御される遺伝子を網羅的に同定する RNA-Seq を相補的に用いる。これにより、標的転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子を網羅的かつ高精度に検出することができる。このシステムを用いて筆者らは、糸状菌 *A. nidulans* 由来の転写因子 AmyR によって直接的に発現制御される遺伝子を同定した。

また近年、筆者らは、糸状菌 *A. oryzae* におけるキシロース代謝関連転写因子 XlnR によって直接的に制御を受ける遺伝子の同定を行った。さらに、制御プロモーター中の XlnR 結合配列の頻度をパラメーターとしたデータ・マイニングを実施し、XlnR 結合配列の個数と下流遺伝子の XlnR 依存的な発現変動との間に密接な相関があることを示した。

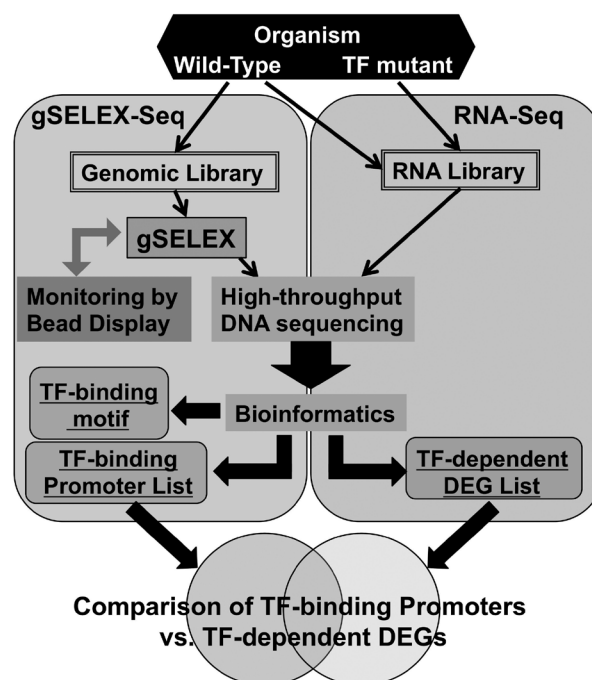


図2. 高速DNA シークエンシングを用いた転写制御機構の解析システム (Kojima et al. PLOS ONE 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0159011)

おわりに

筆者らは、膨大な分子ライブラリーより目的の機能を有する生体高分子をいかに効率良く獲得するか、という点にフォーカスして研究を行ってきた。そして、その過程でビッグデータ解析の必要性に直面し、バイオインフォマティクス技術を本研究に活用してきた。今後も、バイオインフォマティクスを軸とした様々な研究アプローチを通じて農芸化学研究に貢献していきたい。

謝 辞 本研究は、主に名古屋大学大学院生命農学研究科において行われたものです。学生時代より温かくかつ細やかなご指導ご鞭撻を賜り、本研究遂行の機会と、研究者の道を選ぶきっかけを与えていただきました名古屋大学教授・中野秀雄先生に心より感謝申し上げます。また、折りに触れてご助言とご支援を賜りました名古屋大学名誉教授・山根恒夫先生、名古屋大学准教授・岩崎雄吾先生、静岡県立大学准教授・河原崎泰昌先生に厚く御礼申し上げます。ポスドク時代より常に温かいご支援をいただいております大阪府立大学教授・藤井郁雄先生に心より感謝申し上げます。アメリカ留学時代は、テキサス大学教授・George Georgiou先生のもとで充実した研究生活を送ることができました。厚く感謝を申し上げます。また、本研究の展開に際して常日頃より多大なるご助言とご支援を賜っております名古屋大学教授・小林哲夫先生ならびに名古屋大学教授・人見清隆先生に心より感謝を申し上げます。また、本研究遂行にあたり、様々な面でサポートを賜りました分子生物工学研究室関係者の皆様ならびに共同研究者の皆様へ改めて感謝を申し上げます。そして、日々の生活を支えてくれている妻、子供達、両親に感謝を伝えます。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会中部支部長・吉村徹先生、ご支援くださいました日本農芸化学会の先生方ならびにお世話になったさんわかメンバーに厚く御礼申し上げます。