博士論文

論文題目　　Gタンパク質共役受容体のペプチドアゴニスト
創出システムの開発

氏　　名　　櫻井　貴志

目次

略記一覧 4

第 1 章　序論

1.1　G タンパク質共役受容体 5

1.2　GPCR リガンド創出の現状と問題点 5

1.3　*in vitro* compartmentalization 法を利用したリガンドライブラリ作製 6

1.4　酵母を用いたリガンドアッセイ 7

1.5　本研究の目的および本研究で開発するシステムの概要 8

第 1 章の図 10

第 2 章　高速かつ均一な液滴作製システムの構築

2.1　序文 14

2.2　材料及び実験方法 14

2.3　液滴作製システムの評価 18

2.4　小括 21

第 2 章の図 22

第 3 章　液滴 PCR を用いた DNA 提示ビーズの作製

3.1　序文 26

3.2　材料及び実験方法 27

3.3　実験結果及び考察 34

3.4　小括　35

第 3 章の図　37

第 4 章　同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイ系の構築

4.1　序文　40

4.2　材料及び実験方法　42

4.3　実験結果及び考察　49

4.4　小括　51

第 4 章の図　52

第 5 章　液滴回収と DNA 増幅

5.1　序文　57

5.2　材料及び実験方法　57

5.3　実験結果及び考察　62

5.4　小括　62

第 5 章の図　64

第 6 章　構築した系の概念実証実験

6.1　序文　66

6.2　材料及び実験方法　66

6.3　実験結果及び考察　76

6.4　小括　77

第 6 章の図　78

第 7 章　総括および今後の展望

7.1　本研究の総括　81

7.2　今後の展望　82

引用文献　84

謝辞　92

略記一覧

a.u.	arbitrary unit
AD	analog to digital
bp	base pair
DA	digital to analog
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EM-CCD	electron multiplying charge coupled device
GPCR	G protein-coupled receptor
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IVC	*in vitro* compartmentalization
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MOPSO	2-hydroxy-3-morpholinopropanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PDMS	poly(dimethylsiloxane)
RNA	ribonucleic acid
ROI	region of interest
S.D.	standard deviation
SD	synthetic defined
SST	somatostatin
SSTR	somatostatin receptor
TIFF	tagged image file format
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
W/O	water-in-oil

第 1 章　序論

1.1　G タンパク質共役受容体

G タンパク質共役受容体（GPCR: G protein-coupled receptor）は，酵母からヒトに至る真核細胞に共通して見られる膜貫通型受容体の一種である．GPCR は細胞外に N 末端，細胞内に C 末端が存在し，その間に 7 回膜貫通ドメインが存在する特徴的な構造を有し，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て細胞内へ伝える役割を担っている［1, 2］（**Fig. 1.1**）．細胞内のシグナル伝達は，GPCR と共役する G タンパク質を起点とし下流では様々な伝達経路にわかれ，数多くの細胞内応答に関与することが知られており，GPCR を介したシグナル伝達の機能障害は様々な疾患の原因となる．現在，多くの治療薬がこれを標的としているだけでなく，新薬開発においても最大の標的の一つとなっている［3-7］（**Fig. 1.2**）．

1.2　GPCR リガンド創出の現状と問題点

現在精力的に行われている新薬開発の主な手法は，化合物ライブラリを用いて標的 GPCR に結合する化合物をスクリーニングする方法である．この方法は，ライブラリ規模を大きくしにくい，ライブラリに含まれるリガンドの構造に依存するため，新規構造を有する活性化

合物を得ることが困難であるという問題がある．また，化合物ライブラリは実験室で簡単に使用するのが難しいという問題もある．

また既存のリガンド探索手法は，標的とする GPCR を動物培養細胞に発現させ，リガンド候補を作用させた際に起こる細胞の変化を観測することを基本にしている．しかし，動物培養細胞には多数の内在性 GPCR が発現しており，この内在性 GPCR がリガンド候補に応答することによって細胞内応答が観測されてしまい，標的 GPCR に特異的に作用しているかわかりにくくなる偽陽性の問題が存在する．

1.3 *in vitro* compartmentalization 法を利用したリガンドライブラリ作製

GPCR はペプチドをリガンドとしていることが多く，標的と高い特異性で結合できるという特徴に注目し，リガンドライブラリとしてペプチドを選択した．ペプチドライブラリは，DNA と再構成型無細胞転写翻訳系から作製することができるため，DNA のライブラリを用意すれば，ペプチドのライブラリを安価かつ容易に得ることができる．また，ペプチドのアミノ酸残基数に応じて，ライブラリの規模を大きくすることができる［8, 9］．更に，DNA に変異を入れた配列を用いたライブラリを用いることで，従来の理論や既存の立体構造の組み合わせだけでは予測・設計が困難な多様性に富んだペプチドライブラリを作製することができる．

DNA ライブラリから，ペプチドライブラリを作製する際に重要となるのが，選択された分子に対応する遺伝子がすぐに分かるような工夫，すなわち「表現型」と「遺伝子型」 の対応付けである．対応付け技術として現在までに，生物種を用いた手法（細胞表面ディスプレイ法［10-13］，ファージディスプレイ法［14-16］），生物種を用いない（無細胞タンパク質合成系を用いた）手法（mRNA ディスプレイ法［17, 18］，リボソームディスプレイ法［19］，*in vitro* compartmentalization（IVC）法［20-24］など）が開発されている（**Fig. 1.3**）．生物種を

用いない手法は，生物種を用いる手法に比べ，ライブラリの規模やスループットを大幅に向上させることが可能となる．ところが，mRNA ディスプレイ法やリボソームディスプレイ法は，安定性が乏しい RNA を回収する必要がある，GPCR との結合を確認するのみで，細胞内にシグナルが正しく伝わるアゴニスト活性を持つものが取りにくいといった問題点がある．そこで，IVC 法に着目した．

IVC 法では，water-in-oil（W/O）型液滴内に DNA と対応するペプチドリガンドを同時に封入することで，DNA とペプチドリガンドを直接結合することなく 1 対 1 に対応づけることができ，また安価な材料のみで容易に液滴作製が可能となる．そこで，以下のようなアゴニスト創出システムを考えた．ランダム配列を有する鋳型 DNA，無細胞転写翻訳系，リガンドアッセイを行える系を液滴内に封入する．この中でペプチドリガンドを合成させ，標的 GPCR を作動するペプチドリガンドが合成されれば，液滴が蛍光を放つようにする．このような液滴を回収し，その中の DNA の配列を確認することで，ペプチドリガンドの同定を行う．これを繰り返すことで，標的 GPCR を強力に作動させるペプチドアゴニストを取得する．

1.4　酵母を用いたリガンドアッセイ

出芽酵母は，真核細胞の生命現象の基本的な分子機構が保存され，真核細胞のモデル細胞として研究に用いられており，ヒトを含む真核細胞の GPCR による細胞内応答を研究するのにも適している．

出芽酵母の生活環には，一組の染色体をもつ一倍体世代と二組の染色体を持つ二倍体世代が存在する．一倍体世代には，a 細胞とα細胞の 2 種類の接合型（性）が存在する．これらの接合型は，それぞれ a-factor とα-factor という特有の性ホルモン（フェロモン）を分泌し，お互いが十分近接すると相手の接合型のフェロモンを感知して接合を行い二倍体となる．出芽酵母細胞の内在性 GPCR はこのフェロモンを受容する一種類のみで，一倍体世代の

生存・増殖（出芽）に必須ではない．このため，内在性 GPCR のシグナル伝達経路を利用して，標的 GPCR のリガンドアッセイを行えば，従来の哺乳類細胞を用いる方法における，偽陽性の問題を解決することができると考えられる．

GPCR は，リガンドの認識部位が膜貫通ドメイン（のうち細胞外に存在する部位）に，細胞内にシグナルを伝達する最初の因子となる G タンパク質の認識部位が細胞内の C 末端側に存在し，G タンパク質の一つである Gαタンパク質の C 末端側と相互作用している［25-27］．従って酵母細胞の内在性 GPCR をヒト標的 GPCR に置き換えると共に，GPCR からのシグナルを受け取る Gαタンパク質の C 末端側を，ヒトの Gαタンパク質の C 末端側と同じにしたキメラ Gαタンパク質とすれば，内在性のシグナル伝達経路を利用してリガンドアッセイが可能となる［28］．このようなリガンドアッセイは既に多数の成功例が報告されており［29-31］，確立した技術となっている（**Fig. 1.4**）．このリガンドアッセイ方法を IVC 法と組み合わせることによって，GPCR のリガンド創出が可能なのではないかと考えた．

1.5　本研究の目的および本研究で開発するシステムの概要

以上の背景を踏まえ，本研究では，GPCR に作用するペプチドアゴニストの創出システムの確立を目指し，出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を利用したリガンドアッセイ技術と，IVC を用いた遺伝子型と表現型を対応付ける方法を組み合わせた，アゴニスト創出システムの開発を目的とした．本システムの概要を **Fig. 1.5** に示す．まず，ランダムな変異を含む DNA ライブラリを作製する（**1**）．続いて，無細胞転写翻訳系によってペプチドリガンドに転写翻訳される際，十分な分子数を確保するため，マイクロ流体デバイスを用いて作製した液滴内で PCR を行い，ライブラリ各分子を別々に増幅する（**2**）．この際，一方のプライマーをビーズ表面に結合することで，同一種類の DNA を多数同一ビーズ表面に提示する．次に，標的とするヒト GPCR を発現する酵母細胞と DNA 提示ビーズ，及び再構成型無細胞転写翻訳系

を，マイクロ流体デバイスを用いて同一液滴内に封入する（**3**）．この酵母は，唯一の内在性 GPCR である Ste2 下流のシグナル伝達系を遺伝子工学的に改変してあり，リガンド添加に応じて細胞内情報伝達を経て蛍光タンパク質（ZsGreen）を発現する．従って，他の GPCR へ結合することによって生じる偽陽性の問題を生じない．液滴内で無細胞転写翻訳されたペプチドが標的 GPCR を作動させると，酵母が ZsGreen を発現し蛍光を放つ（**4**）．蛍光を放つ酵母細胞と DNA 提示ビーズが共封入される液滴を回収した後（**5**），PCR で増幅し，配列を決定することでリガンドの同定を行う（**6**）．

第 1 章では，本研究の背景となる GPCR を対象としたリガンド創出の現状と問題点，それらを解決する本研究のシステムの概要について述べた．

第 2 章から第 5 章までは，本研究で構築するシステムの基盤技術について述べる．

第 2 章では，マイクロ流体デバイスを用いた W/O（Water-in-Oil）型液滴作製システムの構築，及びその評価について述べる．

第 3 章では，液滴内 PCR を用いたライブラリの増幅系の構築，及びその評価について述べる．

第 4 章では，ヒト由来ソマトスタチン受容体を用いて，同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイが可能な系の構築と評価について述べる．

第 5 章では，得られた液滴を回収する手法について述べる．

第 6 章では，ヒト由来のソマトスタチン及びその受容体を用いて行った概念実証実験について述べる．

第 7 章では，本研究の総括，及び今後の展望について述べる．

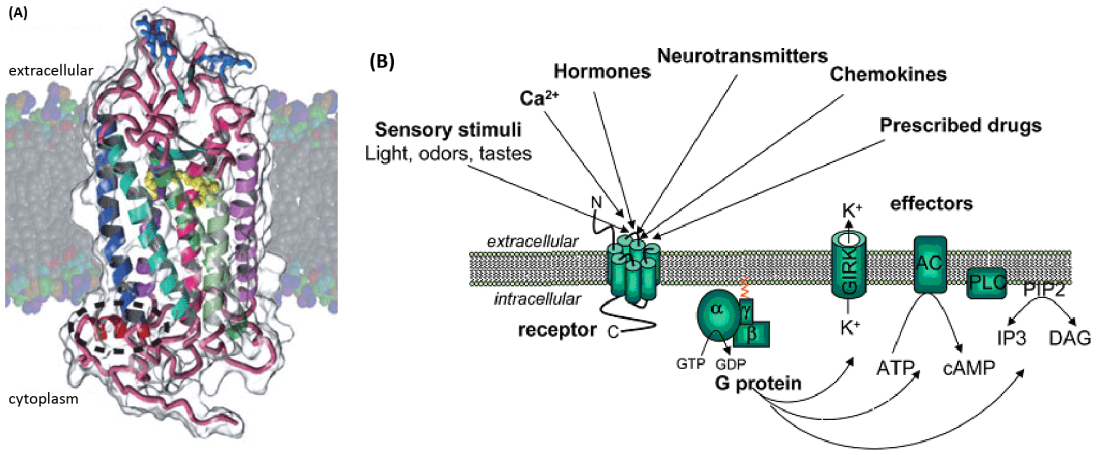

Fig. 1.1　GPCR の構造と GPCR を介したシグナル伝達

(A) GPCR の構造．7 回膜貫通ドメインはαヘリックス構造をしており，N 末端が細胞外に，C 末端が細胞内に存在する．図は［1］から引用改変．

(B) GPCR を介したシグナル伝達．細胞外からの様々なシグナルは，各種 GPCR を経由して細胞内に伝わる．細胞内では共役する G タンパク質を経由して様々な経路の細胞内応答を行う．図は［3］から引用転載．

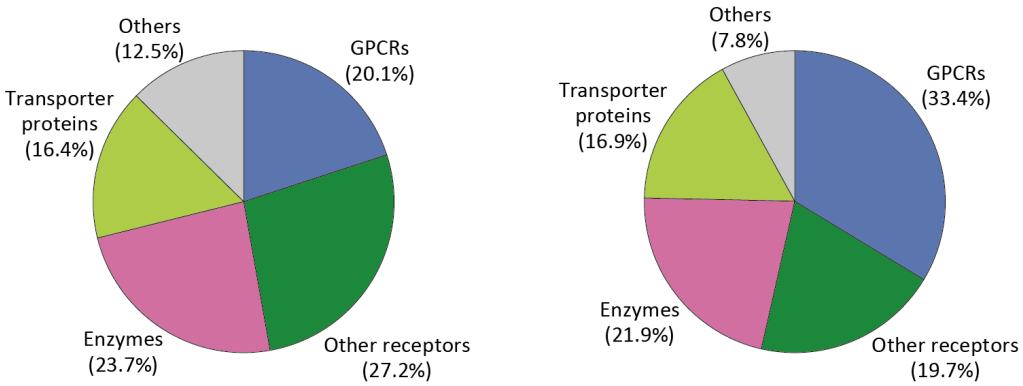

Fig. 1.2 創薬のターゲットの種別割合

左側は研究段階の薬の標的分子，右側は既に市場に流通している薬の標的分子．GPCR は常に創薬研究の最大の標的とされている．図は［7］の論文のデータをもとに作成した．

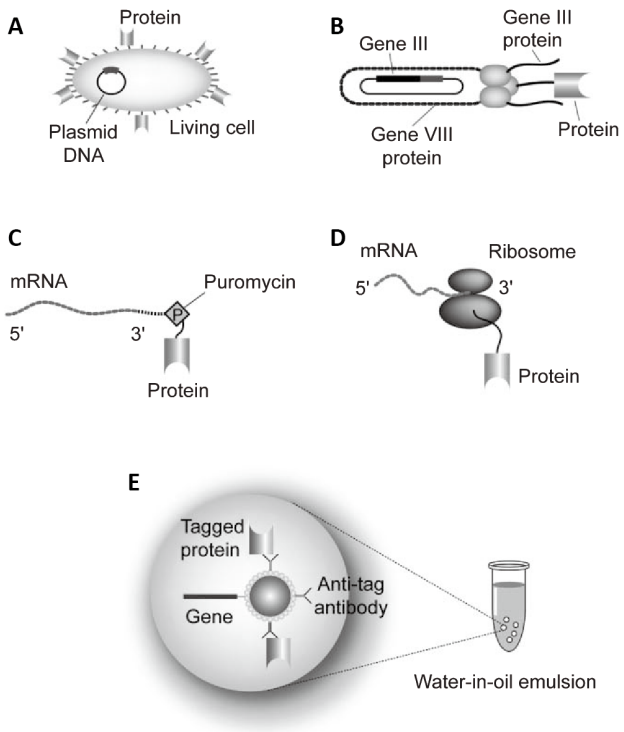

Fig. 1.3　遺伝型と表現型の連結手法

(A)　細胞表層ディスプレイ法
(B)　ファージディスプレイ法
(C)　mRNA ディスプレイ法
(D)　リボソームディスプレイ法
(E)　*in vitro* compartmentalization（IVC）法
図は［32］から引用転載.

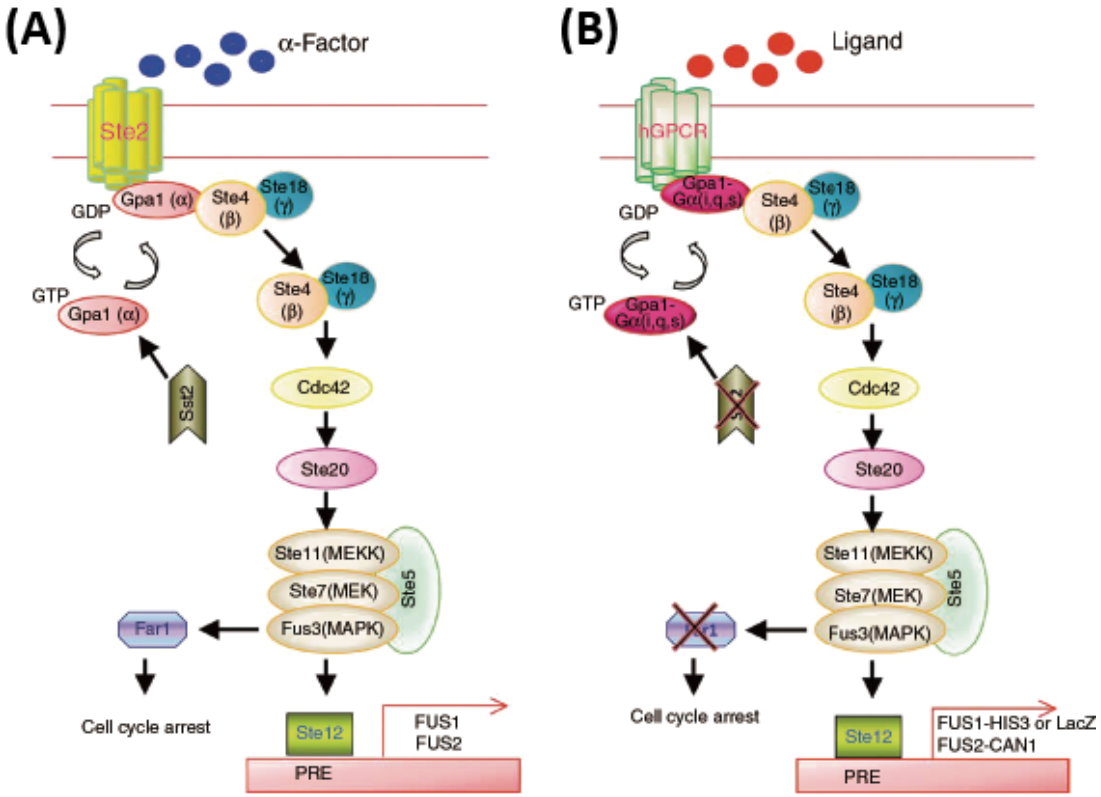

Fig. 1.4　出芽酵母の Ste2 を介した細胞内シグナル伝達経路とその改変

(A)　Ste2 を介した細胞内シグナル伝達経路．Ste2 がα-factor により刺激されると，細胞内シグナル伝達経路（MAPK カスケード）が活性化し，接合に必要なタンパク質をコードする遺伝子の発現が誘導される．

(B)　Ste2 を介した細胞内シグナル伝達経路の改変．内在性の Gαタンパク質の C 末端を改変し外来性の GPCR と共役するようにし，外来性 GPCR を Ste2 に置き換えて発現させると，**(A)**と同一のシグナル伝達経路をたどるようになる．発現が誘導される遺伝子をレポーター遺伝子に置換すれば，リガンド応答を可視化できるようになる．また一部の因子（Set2, Far1）をノックアウトすれば，シグナル伝達の減衰を抑制することができる．

図は［28］から引用転載．

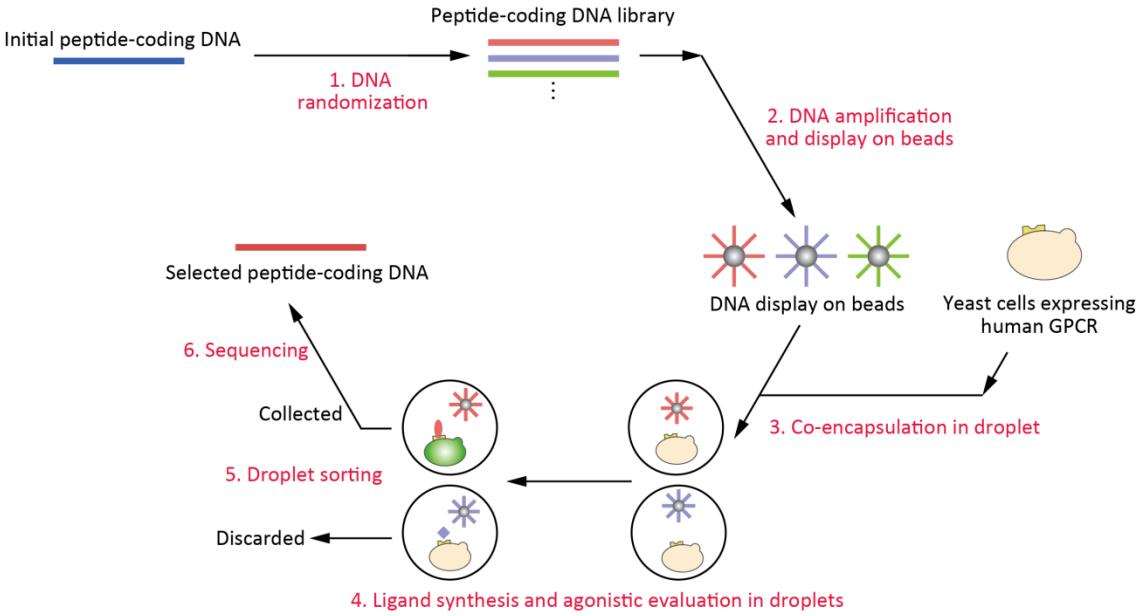

Fig. 1.5　液滴を用いたペプチドアゴニスト創出システム

スタートとなるペプチドをコードする DNA 配列を元に，変異を導入した DNA ライブラリを構築し（1），これらを別々の磁気ビーズ上に多数提示する（2）．標的となるヒト GPCR を発現する酵母細胞と共に液滴に封入し（3），液滴内でリガンド合成とリガンドアッセイを行う（4）．封入された DNA から合成されたペプチドが GPCR を作動させると，酵母細胞が蛍光を放つので，このような液滴を回収し（5），中から DNA を回収し，配列を同定する（6）．

第 2 章　高速かつ均一な液滴作製システムの構築

2.1　序文

本研究で考案したペプチドアゴニスト創出システムでは，液滴を作製し内部で PCR，リガンド合成・リガンドアッセイを行う．この際，封入されるテンプレート DNA，磁気ビーズ，酵母細胞などの量を均一にできなければ，内部の反応が異なり液滴間のばらつきが大きくなってしまう．そのため，均一な大きさの液滴を作製する必要がある．また，液滴に封入する水溶液には磁気ビーズや細胞など比重の異なる物質が含まれるため，長時間の液滴作製は，実効濃度の偏りを生じ液滴間の条件が均一にならない．そのため，液滴を均一かつ高速に作製できるシステムが必要である．

液滴を作製する手法は水溶液とオイル溶液を混合，遠心する方法が知られている［20］が，径分布の揃った液滴を効率よく作製することは難しい．それに対して，マイクロ流体デバイスを用いる手法は一様な径を容易に作ることができる［33］．そこで本章では，マイクロ流体デバイスを用いた高速・均一径の液滴の作製システムを構築し，評価を行った．

2.2　材料及び実験方法

2.2.1　使用した試薬・機器

試薬

Diethylhexyl Carbonate（TEGOSOFT DEC）	EVONIC
(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane	Gelest
Poly(dimethylsiloxane)（SILPOT 184）	東レダウコーニング
Polyglyceryl-4 Isostearate（ABIL WE 09）	EVONIC
Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate（Tween 80）	東京化成
Polyphenyl-methylsiloxane（AP 200）	Sigma-Aldrich
Sorbitan monooleate（Span 80）	東京化成
Triton X-100	ナカライテスク
ミネラルオイル	Sigma-Aldrich

その他の試薬は，和光純薬試薬から購入した.

器具・機器

ガラスベースディッシュ（35 mm/Glass 12 ϕ）	IWAKI
カバーガラス（24×40 mm，thickness No.1）	松浪ガラス
強制循環式定温恒温器（SSSF-111）	いすゞ制作所

顕微鏡システム（液滴作製用）

倒立顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（UApo/340 20x）	オリンパス
高速カメラ（LRH2500XE）	デジモ
電空レギュレーター（ETR010）	コガネイ

DA 変換ボード（PEX-340416）	Interface
AD 変換ボード（PEX-321216）	Interface
コンプレッサ（DPP-AYAD）	コガネイ
エアタンク（DPT-T18-V）	コガネイ

顕微鏡システム（液滴径観察用）

倒立型顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（PlanApo Oil 60x）	オリンパス
EM-CCD カメラ（C9100-13）	浜松ホトニクス
外部循環付恒温水槽（ZL-100）	タイテック

2.2.2 液滴作製デバイスの概要

マイクロ流体デバイス（**Fig. 2.1 A**）は 2 個のインレット（水溶液，オイル溶液），1 個のアウトレット（液滴回収溶液），十字状の流路をもつ．流路は液滴を作製する合流部では幅 40 µm で，それ以外では幅 100 µm である．深さはどの流路も同じで 40 µm あるいは 75–80 µm である（本章では 40 µm のものを用いた）．作製する液滴は，水溶液がオイル溶液によって合流部で剪断応力により切り取られることによって作製する．

2.2.3 液滴作製デバイスの作製

前節で示したマイクロ流体デバイスは poly(dimethylsiloxane)（PDMS）製のチップとカバーガラスを貼り合わせ作製した（**Fig. 2.1 B**）．PDMS チップは，シリコン基板の鋳型から作製した．鋳型は，早稲田大学理工学術院先進理工学研究科庄子研究室の関根瑠威氏・井口彩香氏・

川久保渉氏に作製していただいた．PDMS と付属の硬化剤を 10:1 の重量比で混合し，アスピレーターで 45 分間脱気した. 鋳型を並べたジグに PDMS を流し込み, 110˚C のヒーター（SSSF-111）で 60 分間加熱して PDMS を固めた．チップを鋳型からはがし，カバーガラスと貼り合わせた．

W/O 型液滴を安定に作製するためには，デバイスの流路表面を疎水的にする必要がある．そこで．既報［34, 35］を参考に，デバイス表面にフルオロシラン化コーティングを施した．0.1% (v/v) (Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane-エタノール溶液を各インレットに 50 µL 入れ，5 kPa の圧力で流れ切るまで流した．洗浄のためにエタノールを同量入れ流した後，80˚C のヒーターで 30 分加熱し，フルオロシラン化コーティングのアニーリングを行った．

2.2.4 圧縮空気を用いた液滴作製

前節で作成したマイクロ流体デバイスを，専用ホルダーに入れて倒立型顕微鏡にセットした．ホルダーを 2 台の電空レギュレーターと接続し，水溶液およびオイル溶液を圧縮空気により送液（**Fig. 2.1 C**）し，液滴を作製した．圧力調整は DA 変換ボード（PEX-340416）により電空レギュレーターへ信号を入力することで行い，AD 変換ボード（PEX-321216）により出力値を取得して，正しく制御されていることを確認した．ハロゲンランプを照射し，流路内の液滴を高速カメラにて撮影した．

2.2.5 作製した液滴の観察

前節で得られた液滴を，液滴作製後一定時間経過毎にガラスベースディッシュに移して倒立顕微鏡で観察した．対物レンズは油浸レンズ（PlanApo Oil 60x）を用いた．観察は，ハ

ロゲンランプを照射し, 液滴を確認して明視野像を EM-CCD カメラを用いて露光時間 200 ms で 1 フレーム撮影により取得した.

2.2.6 データ解析

取得した画像を TIFF 形式に変換した後，ImageJ（http://rsbweb.nih.gov/ij/） を用いて解析を行った. 液滴の径は，液滴が円として撮影されることを利用して，円の面積を測定したあと直径を計算した. データの階級化およびフィッティングは, KaleidaGraph（Synergy Software）を用いて行った.

2.3 液滴作製システムの評価

2.3.1 オイル溶液組成を変化させた際の液滴径の変化

オイル溶液の組成によっては，液滴内部から水が漏出し，液滴の急激な体積変化と，液滴内部の溶液組成の変化が引き起こされる可能性がある. そこで，どのような組成で作製する液滴が最も安定であるかを調べるため，まず既報［36-41］を参考に **Table 2.1** に示す 4 通りのオイル溶液を用いて液滴を作製し, 液滴径の時間変化を測定した. 組成 **A** 及び組成 **B** は，液滴内での無細胞転写翻訳を行う系に利用されている組成である. また，組成 **A** 及び組成 **C** は，液滴を用いた PCR に利用されており温度変化に対しても安定性が高いと考えた. 組成 **D** は，流速を急激に変化させながら液滴を作製する方法で利用されており，流体から液滴にかかる力に対して高い安定性を示す. そのため，本システムにおける液滴作成直後の流速の変化に対しても安定ではないかと考えた. いずれの測定も水溶液に Milli-Q 水を用いて液滴を作製した.

Table 2.1　オイル溶液の組成

(A)		**(B)**	
ミネラルオイル	95% (v/v)	ミネラルオイル	95% (v/v)
Span 80	4.5% (v/v)	Span 80	4.5% (v/v)
Tween 80	0.45% (v/v)	Triton X-100	0.5% (v/v)
Triton X-100	0.05% (v/v)		

(C)		**(D)**	
TEGOSOFT DEC	73% (v/v)	AP 200	99.9% (v/v)
ミネラルオイル	20% (v/v)	Span 80	0.1% (v/v)
ABIL WE 09	7% (v/v)		

組成 **A**, **B**, **C**, **D** はそれぞれ［36］,［37］,［38］,［39］の文献の組成を参考にした.

結果を **Fig. 2.2** に示す．組成 **D** は流路内で液滴は作製されるものの，アウトレット部で全ての液滴が合一してしまったため，不適と判断した（**Fig. 2.2** には載せていない）．組成 **C** では，作製直後から急激に径の縮小が認められ，20 分後には液滴が確認されなくなった．組成 **A** 及び組成 **B** は 60 分の観測の間は安定に存在したものの，組成 **B** の方がやや径が縮小することがわかった．以上の結果から，組成 **A** （95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80, 0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100）が最良と考え，以下この組成で液滴を作製した.

2.3.2　送液圧力による液滴径の変化

磁気ビーズは直径 2.8 μm の球形で，出芽酵母は直径 5-8 μm の球形をしている．従って液滴に封入する場合には，液滴の大きさをそれ以上にする必要がある．一方，DNA 分子や酵母

細胞を封入することを考えると，液滴の体積は小さくする方が，1 つの液滴に多数の DNA や酵母細胞を封入する可能性を減らすことができる．そこで，本システムで用いる液滴径を最適化するため，水溶液，オイル溶液の送液の圧力を変化させた際の液滴径の変化を測定した．

水溶液には Milli-Q 水を用い，オイル溶液の組成は，前節の結果を用いて，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 とした．その結果，液滴の直径は約 80–15 µm の間で制御できることがわかった（**Fig. 2.3**）．また，15 µm よりも小さな径の液滴はできず水溶液がシース状に流れてしまうことがわかった．更に，流路深さが深い 75–80 µm のタイプでは，流路抵抗が低く同一の送液圧力でも送液量が増加するため，作製速度を向上させることができる一方で，30 µm よりも小さな径の液滴は作製が困難であることがわかった．この結果から，液滴径の大きさはマイクロ流体デバイス毎の差が生じることを考慮し，以後は直径 40 µm で用いることにした．流路深さ 75–80 µm のタイプでは，送液圧力を調節することで毎秒 10^3–10^4 個の液滴を作製できることがわかった．

2.3.3 液滴径の均一性評価

続いて，今回用いたマイクロ流体デバイスで作製する液滴の均一性を評価した．前節の実験で水溶液の送液圧力を 10 kPa，オイル溶液の送液圧力を 25 kPa として液滴径約 40 µm の液滴を作製した時の，液滴毎の径の分布を測定した．

Fig. 2.4 に，液滴径の分布を示す．直径の変動係数が 0.1％未満と非常に小さく，均一な径の液滴が作製できることが確認された．直径の測定は画像データのピクセル数を直径に変換するため，その際の読み取り誤差などが生じることを考慮すれば，液滴の実際の変動係数は更に小さく，極めて均一な液滴を作製できると推定された．

2.4　小括

マイクロ流体デバイスを用いて，磁気ビーズや出芽酵母を封じ込めるのに適した大きさの液滴を均一かつ高速に作製することに成功した．いくつかのオイル組成の中から，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 のオイル組成が最良であると判断し，以後このオイル組成を用いて実験を行うことにした．

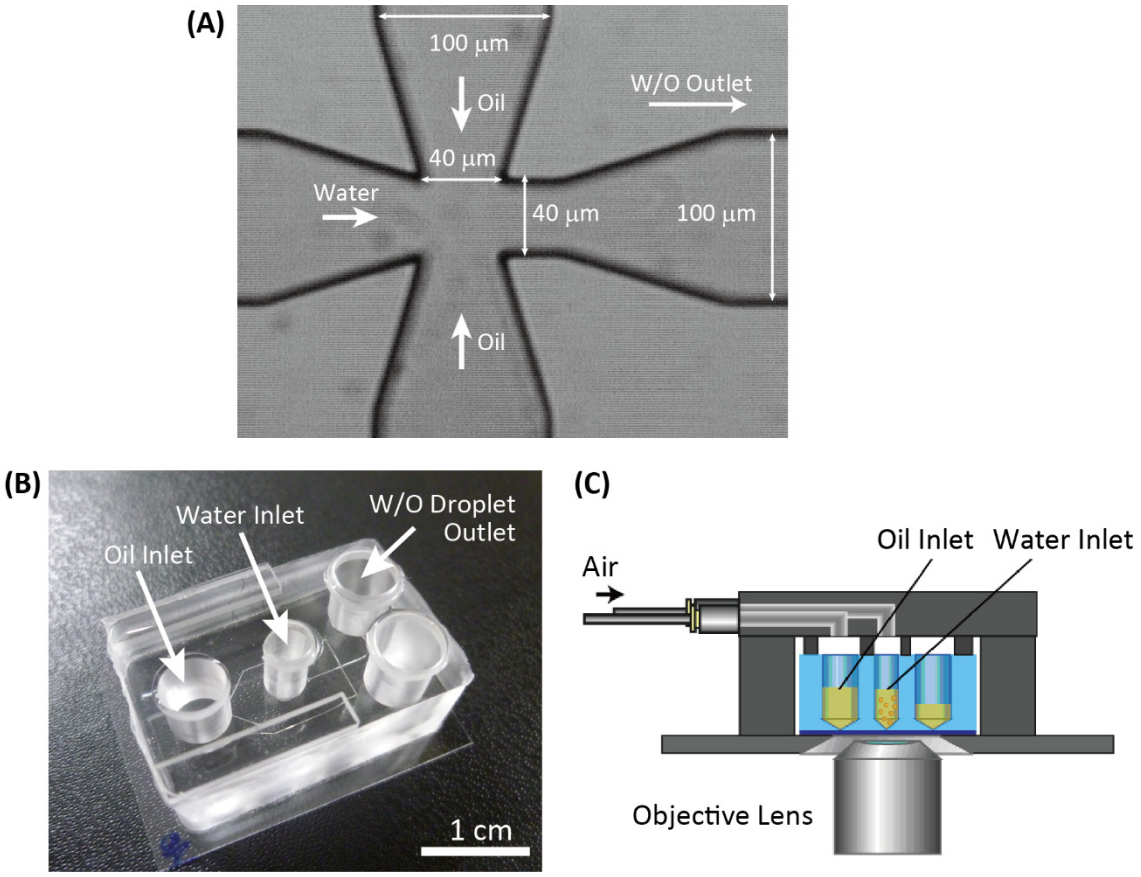

Fig. 2.1　液滴作製用マイクロ流体デバイスの構造

(A) 液滴作製部の構造．左側から流れてくる水溶液を上下方向から流れてくるオイル溶液が剪断し右側の流路に W/O 型液滴が流れていく．流路深さはデバイス内全て同一で，40 μm あるいは 75–80 μm.

(B) マイクロ流体デバイスの外観.

(C) マイクロ流体デバイスの送液システム．**(B)**のチップ（図の青部）を，2 台の電空レギュレーターにつないだデバイスホルダーに挿入し，圧縮空気により水溶液およびオイル溶液の送液を行う.

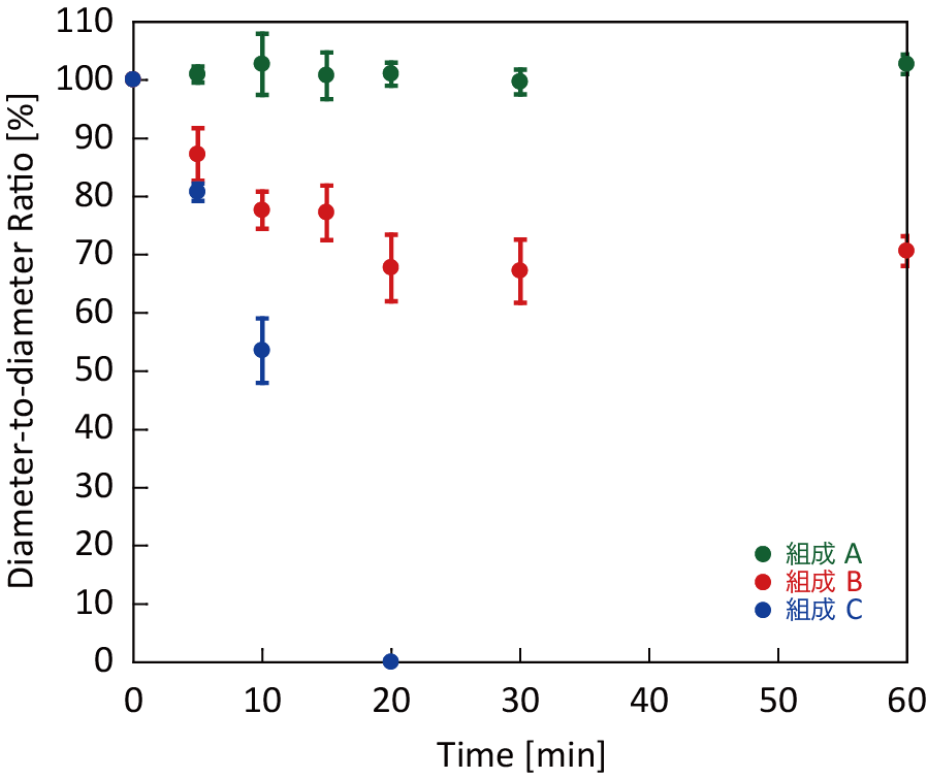

Fig. 2.2　液滴作製後の時間変化に伴う液滴径の変化

オイル溶液の組成は **Table 2.1** に示した．組成 D はアウトレットで液滴が合一したので，時間変化を測定できなかった．縦軸は観測開始時の液滴の直径を 100%としたときの相対的な直径の値を示す．エラーバーは標準偏差（S. D.）を示す．*N*>10.

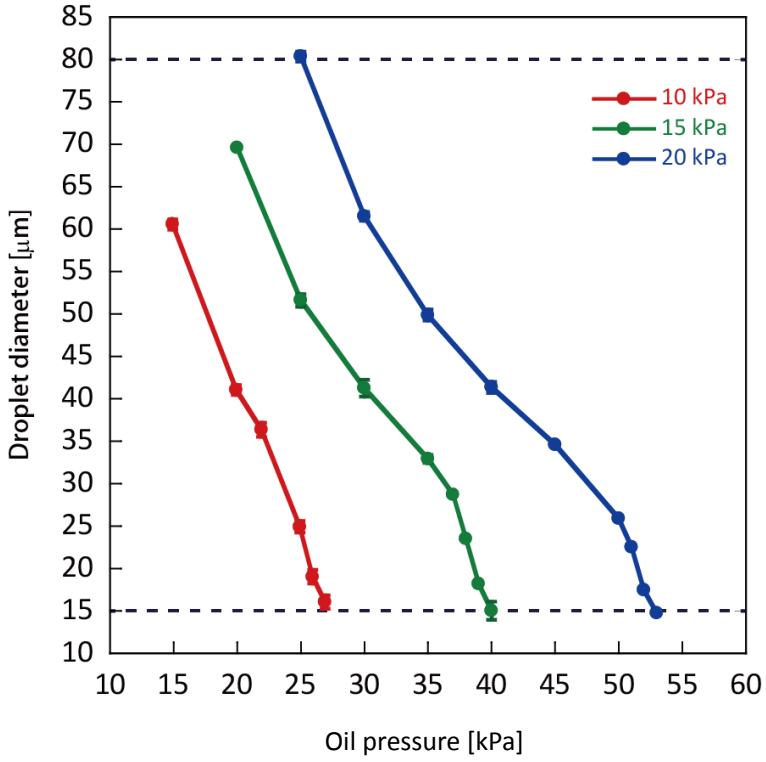

Fig. 2.3　送液圧力による液滴径の変化

水溶液の送液圧力を 10 kPa（赤），15 kPa（緑），20 kPa（青）としたときのオイル溶液（95% (v/v)ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100）の送液圧力を変化させた場合の液滴径の変化．グラフに示されている範囲でオイル溶液を送液した時，直径 80–15 μm の液滴が作製できた．オイル溶液の送液圧力が最低圧力以下の時には水溶液が，剪断されずシース流となり，最大圧力以上では水溶液が押し戻される現象が確認された．

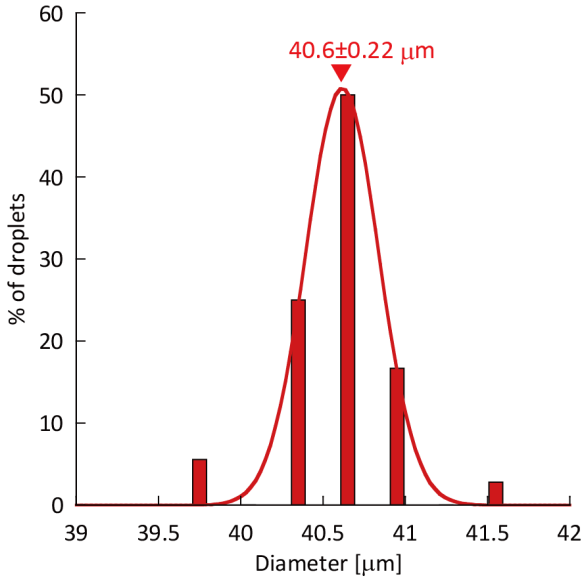

Fig. 2.4　作製された液滴の直径の分布

分布は正規分布の式でフィッティングした．表示されている値は，平均±標準偏差（S.D.）を示す．*N*=50.

第 3 章　液滴 PCR を用いた DNA 提示ビーズの作製

3.1　序文

同一液滴内でリガンド合成とリガンドアッセイを行う際，リガンド応答に十分量のペプチド分子が液滴内で合成されないと，そのペプチドが標的 GPCR のリガンドであるかどうかを判定することが難しくなる．また，スクリーニング後に液滴を回収した後，リガンドを合成する DNA の配列を決定する必要があるが, 封入される DNA 分子数が極少量であると, PCR によって増幅することが非常に難しい．これらの問題を解決するためには，液滴内に封入する DNA の分子数を増やす必要がある．しかしランダムに DNA 分子を封入すると 1 つの液滴内に多種類の DNA 分子が存在してしまい，各々の DNA に対応するペプチドが十分量合成できずリガンドアッセイを行えない可能性を排除できない．また，リガンド応答するペプチド分子があった場合でも，対応する DNA を決定することが難しくなる．したがって，封入する DNA は数種類の分子が数多く存在するという条件を満たす必要がある．

この条件を満たすために，磁気ビーズ表面に同一の DNA を多数固定し，この磁気ビーズをリガンド合成及びリガンドアッセイを行う液滴内に封入する方法を用いた．同一の DNA を多数固定する手法として，一方のプライマーを表面に提示した磁気ビーズを用いた液滴 PCR を適用することにした（**Fig. 3.1**）.

本章では，磁気ビーズへの DNA 分子の固定化と，液滴 PCR によって増幅された DNA 分子数の評価など，液滴 PCR を用いた DNA 提示ビーズの作製について述べる．

3.2 材料及び実験方法

3.2.1 使用した試薬・機器

試薬

Dual-biotin-F1 primer	Integrated DNA Technologies
Dynabeads M270 streptavidin	Thermo Fisher Scientific
(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane	Gelest
KOD -plus-	東洋紡
Primers (F2-primer, Rev-primer, Cy5-primer)	Sigma-Aldrich
Nuclease-free water	QIAGEN
Poly(dimethylsiloxane)	東レダウコーニング
Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate（Tween 20）	東京化成
Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate（Tween 80）	東京化成
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
Sorbitan monooleate（Span 80）	東京化成
Triton X-100	ナカライテスク
ミネラルオイル	Sigma-Aldrich

その他の試薬は，和光純薬試薬から購入した.

器具・機器

ガラスベースディッシュ（35 mm/Glass 12 ϕ）	IWAKI
カバーガラス（24×40 mm，thickness No.1）	松浪ガラス
サーマルサイクラー（PTC-200 Peltier Thermal Cycler）	MJ RESEARCH

強制循環式定温恒温器（SSSF-111）	いすゞ制作所
恒温撹拌機（Thermomixer comfort）	Eppendorf
微量高速冷却遠心機（MX-300）	トミー精工
超微量分光光度計（NanoDrop）	Thermo Fisher Scientific

顕微鏡システム（液滴作製用）

倒立顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（UApo/340 20x）	オリンパス
高速カメラ（LRH2500XE）	デジモ
電空レギュレーター（ETR010）	コガネイ
DA 変換ボード（PEX-340416）	Interface
AD 変換ボード（PEX-321216）	Interface
コンプレッサ（DPP-AYAD）	コガネイ
エアタンク（DPT-T18-V）	コガネイ

顕微鏡システム（磁気ビーズ観察用）

倒立型顕微鏡（IX-71）	オリンパス
キセノンランプ	オリンパス
対物レンズ（UApo/340 40x）	オリンパス
EM-CCD カメラ（C9100-13）	浜松ホトニクス

3.2.2 圧縮空気を用いた液滴の作製

液滴は，第 2 章に示した方法で作製した．オイル溶液の組成は，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 とした．液滴径は直径 40 μm とした．

3.2.3 液滴 PCR に用いるテンプレート DNA の増幅

本章では，モデルペプチドとしてソマトスタチン（SST）を用いた．SST をコードする DNA 配列（**Fig. 3.2**）を設計し，IDT 社にて人工合成した．この配列を鋳型に **Table 3.1** に示した組成の PCR 溶液を用いて，プラスミドのうち SST をコードする領域を含む部分を増幅した．用いたプライマーの配列を **Table 3.2** に示す．反応は，加熱（94°C，2 min）後，変性（94°C，15 s），アニーリング（50°C，30 s），伸長（68°C，20 s) を 1 サイクルとし，30 サイクル行った．反応液は DNA 精製キット（NucleoSpin Gel and PCR Clean-up）のプロトコルに従って精製したのち，分光光度計（NanoDrop）を用いて濃度を測定した．

Table 3.1　SST をコードする領域を増幅する PCR 溶液組成（単位：μL）

Nuclease-free water	33.0
10× PCR Buffer for KOD -Plus-	5.0
2 mM dNTPs	5.0
25 mM $MgSO_4$	2.0
10 μM F2 primer	1.5
10 μM Rev primer	1.5
Template plasmid (1 ng/μL)	1.0
KOD -plus-	1.0
Total	50.0

Table 3.2　SST をコードする領域を増幅する PCR に用いたプライマー

Primer	Sequence
F2	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Rev	5'-GCCTCAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.2.4　液滴内 PCR によるテンプレート DNA の増幅

（1）ビオチン化プライマーの磁気ビーズ表面への固定

用いた磁気ビーズ（Dynabeads M270 Streptavidin）は表面にストレプトアビジン修飾がなされており，ビオチン修飾を施した標的遺伝子を固定できる．ビーズのような担体に固定されたストレプトアビジンはビオチンとの結合能が著しく低下することが報告されている［42］．そこで，先行研究［40, 43］に従い，ビオチンを 2 分子つなげた構造体（dual-biotin）を 5’端に付与したプライマーを用意した（**Table 3.3, Fig. 3.3**）．

Table 3.3　dual-biotin を付加したプライマーの配列

Primer	Sequence
Dual-biotin-F1	5'-/dual-biotin/GTTACGCTGGAGTCTGAGGC-3'

ビオチン化プライマーの固定は，磁気ビーズのプロトコルを参考に，以下の方法を用いた．まず，Dynabeads 30 μL に，1×B&W buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.01% (v/v) Tween 20) を 30 μL 加え，懸濁した後，磁気分離により溶液を除去した．この洗浄操作を，3 回繰り返した．その後，2×B&W buffer 60 μL で懸濁し，30 μM Dual biotin-F1 primer を 2 μL，Nuclease-free water を 58 μL 加えた．室温で 15–20 分間振盪したあと，上清を取り除いた．再び 1×B&W buffer で 3 回洗浄した後，溶液を取り除き，30 μL の Nuclease-free water に懸濁した．この溶液を以下ビーズ・プライマー溶液と呼ぶ．

（2）ライブラリ分子の磁気ビーズへの固定化

ビーズ・プライマー溶液と PCR 溶液を液滴内に封入して PCR を行うことで，ビーズへの DNA の固定化を試みた．PCR 溶液の組成を **Table 3.4** に示す．磁気ビーズは PCR 溶液よりも比重が大きいため，液滴作製中にインレット内で沈殿し長時間の液滴作製の間に実効濃度が大きく変化してしまう．そこで，液滴作製は 12.5 μL 毎に行い，これを 4 回繰り返した．作製した液滴を PCR チューブに移し，サーマルサイクラーを用いて PCR を行った．反応は加熱 (94^{o}C, 2 min) 後，変性 (94^{o}C, 10 s) ，アニーリング (55^{o}C, 30 s) ，伸長 (68^{o}C, 17 s) を 1 サイクルとし，40 サイクル行った．

Table 3.4　液滴 PCR の水溶液組成（単位：μL）

10x PCR Buffer for KOD -Plus-	5
2 mM dNTPs	5
25 mM $MgSO_4$	2
ビーズ・プライマー溶液	7.5
10 μM Rev-primer	1.5
Template DNA（4.4 pg/μL*）	1
KOD -plus-	1
Nuclease-free water	27
	50

*40.0 ng/μL の DNA に対し，20.9 倍希釈を 3 回繰り返して得られた溶液を用いた．DNA がチューブ内壁などに吸着して実効濃度が低くならないよう，希釈は他の溶液を全て調製した後，最後に行い PCR 溶液に入れた．この場合，マイクロ流路への磁気ビーズの吸着と同程度と仮定すると，平均 4–5 分子が 1 つの液滴に封入される．

（3）磁気ビーズの回収

反応溶液を 1.5 mL チューブに移し，室温で 10,000 rpm で 5 分遠心し，上清を取り除いた．50%(v/v) エタノール (200 µL)を加え再度同じ条件で遠心し，上清を取り除く操作を 2 回行った後，Nuclease-free water を 200 µL 加え，磁気分離で溶液を除去した．得られた DNA 提示磁気ビーズを，5 µL の Nuclease-free water に懸濁した．

3.2.5 液滴 PCR で回収される磁気ビーズ数の評価

プライマーが提示された磁気ビーズは PDMS に吸着しやすいため，液滴 PCR を行う際，液滴に封入される磁気ビーズは予め調製する溶液内に含まれるビーズの一部になる．そこで，液滴 PCR 前後の磁気ビーズの数を評価した．液滴 PCR 前の磁気ビーズは，Nuclease-free water を用いて 10 倍希釈を 5 回行い，そのうち 1 µL を用いて顕微鏡下で磁気ビーズの数を測定した．液滴 PCR 後回収した磁気ビーズは，再度液滴に封入し，液滴内に封入されている数の分布を調べた．液滴に封入される磁気ビーズの数はポアソン分布に従うことから平均封入数を算出した．両者の結果から，液滴 PCR 前後の磁気ビーズの数を決定した．

3.2.6 固定した DNA 分子数の評価

ビーズ表面に固定された DNA 分子数を評価するため，Cy5 標識されたプライマー（**Table 3.2** に示した Rev-primer の 5'末端を Cy5 標識したもの，以後 Cy5-primer と呼ぶ）を用いて PCR を行い，ビーズの蛍光強度を測定した（**Fig. 3.4**）．Cy5-primer を用いた液滴 PCR は R2-primer を Cy5-primer に変更した以外は 3.2.4 節と同様の方法で行った．

提示される DNA 量を比較するため，Dual-biotin 及び Cy5 標識された DNA を PCR によって作製し，これを磁気ビーズ表面に提示したものを用いた．まず，3.2.3 節で作製した DNA をテンプレートとし，**Table 3.5** の組成で PCR を行った．反応後の溶液を DNA 精製キット

（NucleoSpin Gel and PCR Clean-up）のプロトコルに基づき精製し Dual-biotin 及び Cy5 標識された DNA を得た．得られた DNA の濃度を分光光度計（NanoDrop）を用いて測定した．

Table 3.5　Cy5-primer を用いた PCR の溶液組成（単位：μL）

10x PCR Buffer for KOD -Plus-	5.0
2 mM dNTPs	5.0
25 mM $MgSO_4$	2.0
10 μM Dual-biotin-F1 primer	1.5
10 μM Cy5-primer	1.5
Template DNA (1 ng/μL)	1.0
KOD -plus-	1.0
Nuclease-free water	33.0
Total	50.0

磁気ビーズへの固定は以下の方法で行った．まず，Dynabeads 7.5 μL に，1×B&W buffer を 7.5 μL 加え，懸濁した後，磁気分離により溶液を除去した．この洗浄操作を 3 回繰り返した．その後，2×B&W buffer 7.5 μL で懸濁し，Dual-biotin 及び Cy5 標識された DNA を 10 ng/μL に希釈した溶液を 7.5 μL 加え，室温で 15-20 分間振盪した後，上清を取り除いた．再び 1×B&W buffer で 3 回洗浄した後，溶液を取り除き，7.5 μL の Nuclease-free water に懸濁した．

作製したビーズの明視野像及び蛍光像を倒立型顕微鏡（IX-71）を用いて取得した．対物レンズは空浸レンズ（UApo/340 40x）を用いた．キセノンランプの光は投光管を通り，エキサイテイションフィルター（640DF20）通過後，ダイクロイックミラー（Q640LP）で反射し，対物レンズを通過することで試料に照射した．試料からの蛍光は対物レンズで集光し，ダイクロイックミラー，エミッションフィルター（690DF55）通過後，EM-CCD カメラを用いて検出した．観察は，まずハロゲンランプを照射し，磁気ビーズを確認して明視野像を取得し

た．次に，キセノンランプ光を照射し蛍光像を取得した．キセノンランプ光の強度は，対物レンズ出口の位置で 6.0 mW であった．明視野像，蛍光像共に露光時間 100 ms で 1 フレーム撮影により取得した．

3.2.7 データ解析

取得した画像を TIFF 形式に変換した後，ImageJ を用いて解析を行った．磁気ビーズは，まず明視野像を用いて磁気ビーズを ROI で囲み，それを蛍光像に重ね合わせ，ROI 内部の蛍光強度を測定した．データの階級化及びフィッティングは，KaleidaGraph を用いて行った．

3.3 実験結果及び考察

3.3.1 液滴 PCR で回収される磁気ビーズ数の評価

3.2.5 節に示した方法で算出したビーズ数の結果を **Table 3.6** に示す．この結果から，90％以上のプライマー提示磁気ビーズがマイクロ流路内に吸着してしまうことが明らかになった．そこで本システムでは液滴 PCR を行う際，磁気ビーズを 10 倍過剰にすることで，この問題を解決することにした．

Table 3.6 液滴 PCR 前後のビーズ数

液滴 PCR 前	$1.26 \pm 0.17 \times 10^7$
液滴 PCR 後	$8.95 \pm 2.70 \times 10^5$

平均±標準偏差, *N*=4.

3.3.2 固定される DNA 分子数の評価

3.2.6 節に示した方法で行った実験の結果を **Fig. 3.5** に示す. 1 ビーズあたり 10^5 分子の Cy5-DNA を磁気ビーズに結合した場合（**Fig. 3.5 A**）との蛍光強度の比較から，液滴 PCR によって，~3x10^4 分子が 1 つの磁気ビーズに提示されていることが推定された. 液滴内リガンド合成・リガンドアッセイに用いる液滴の直径を~40 μm とすれば，磁気ビーズが 1 つ封入される場合，液滴内の DNA の濃度は約 1–1.5 nM となる．第 4 章 **Fig. 4.6** に示したように，磁気ビーズに~2.5x10^4 分子が提示されており，その DNA が GPCR に作動するペプチドを合成できる配列であれば, 酵母細胞は強い蛍光を放つことから, 本章で検討した条件での液滴 PCR によって，十分な数の DNA 分子を提示することができると結論づけた.

3.4 小括

液滴 PCR を用いて，DNA を磁気ビーズ表面に提示するための条件を検討した．プライマー提示磁気ビーズの吸着などの条件を考慮し，同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイに用いることのできる条件を見出した．以上から，液滴内 PCR を用いた DNA 提示ビーズの作製手法が確立された.

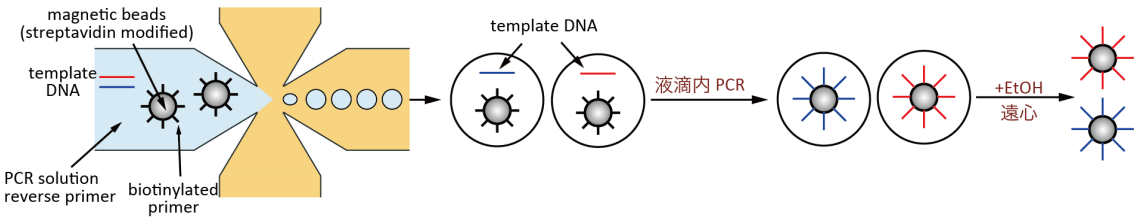

Fig. 3.1　液滴 PCR の概要

第 2 章で構築した液滴作製システムを用いて液滴 PCR 用の液滴を作製した．水溶液には，プライマー提示磁気ビーズと，PCR 溶液，もう一方のプライマーと，テンプレートとなる DNA 分子が含まれている．作製された液滴は PCR チューブに回収され，サーマルサイクラーを用いて PCR を行った．テンプレート DNA をプライマー提示磁気ビーズが共封入されていれば，液滴内でテンプレート DNA が磁気ビーズの周囲に増幅される．PCR チューブから液滴を回収し，エタノールを加えて遠心することで，DNA が提示された磁気ビーズが回収された．

GTAAAACGAC GGCCAGTTTA TCTAGTCAGC TTGATTCTAG CTGATCGTGG

ACCGGAAGGT GAGCCAGTGA GTTGATTGCA GTCCAGTTAC GCTGGAGTCT

GAGGCTCGTC CTGAATGATA TGCGGCCTCG CGAATTAATA CGACTCACTA

TAGGGCTTAA GTATAAGGAG GAAAAAATAT GGCGGGCTGC AAAAATTTTT

TTTGGAAAAC CTTTACCAGC TGCTAATTAC TAGCATAACC CCTCTCTAAT

CGGAGGGGTT TGCGCGTGAT CTTACGGCAT TATACGTATG ATCGGTCCAC

GATCAGCTAG ATTATCTAGT CAGCTTGATG TCATAGCTGT TTCCTGAGGC

Fig. 3.2　ソマトスタチン合成用テンプレート DNA の配列

太字部分が設計した DNA 配列で，太字以外の部分は合成したプラスミド由来の配列を示す．青字部分は T7 プロモーター配列，赤字部分はリボソーム結合部位（Shine-Dalgarno 配列），緑字部分はソマトスタチンをコードする遺伝子配列．再構成型無細胞転写翻訳系（PURE system）での合成には開始コドン（ATG）が必要なため，N 末端にメチオニンが付加されたソマトスタチンが合成される．mRNA の分解を抑制するため，3′ UTR は 2 次構造を形成するよう設計した（下線部の配列が相補的 2 本鎖を形成する）．

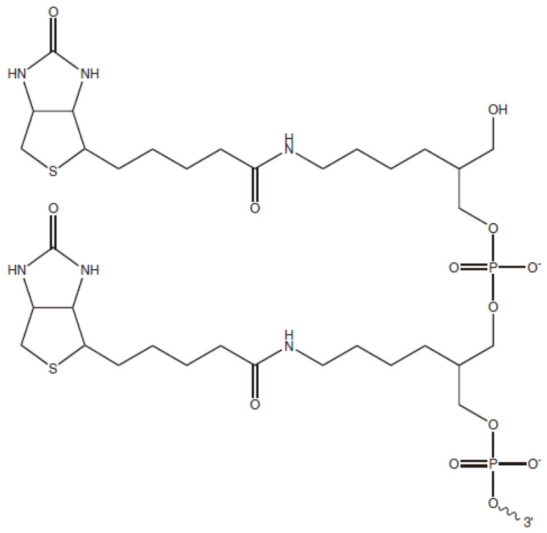

Fig. 3.3　Dual-biotin の構造

図は，http://ruo.mbl.co.jp/custom/images/oligo/IDT2008InternationalCatalog.pdf より転載．

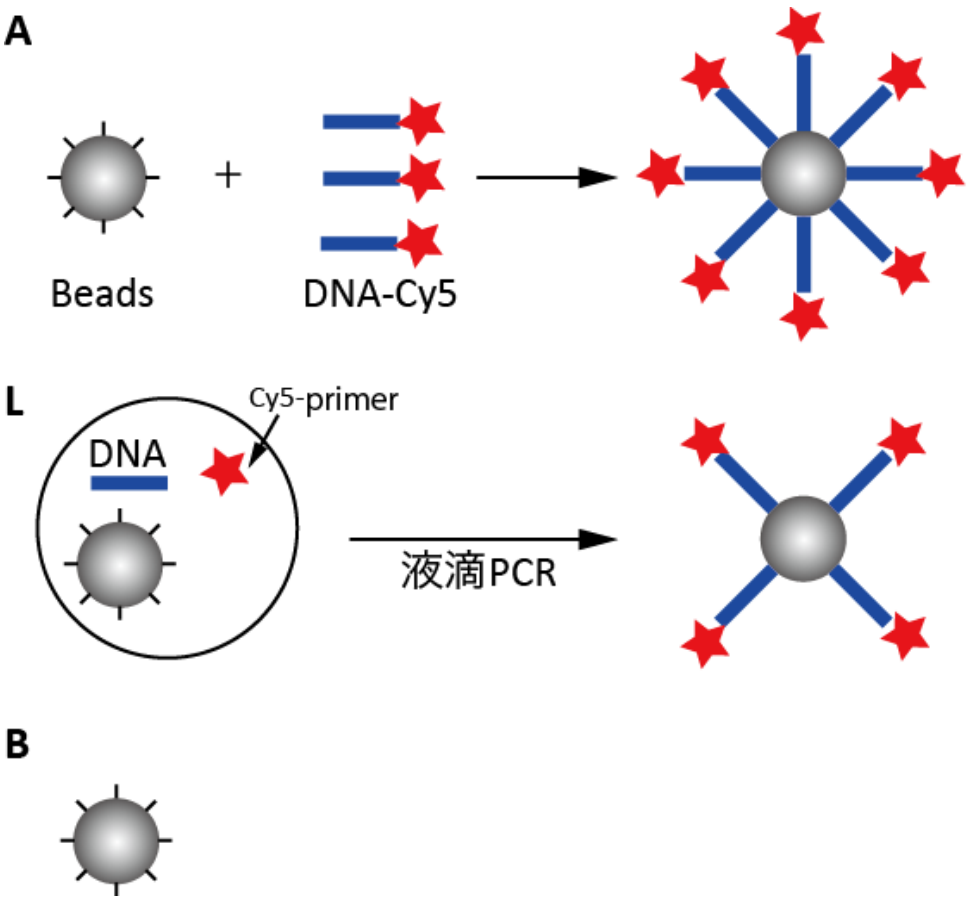

Fig. 3.4　Cy5 提示 DNA を用いた提示 DNA 数の推定

(A) Cy5 標識された濃度既知の DNA を合成し，磁気ビーズに提示させた．

(L) 先にプライマーを磁気ビーズに提示し，もう片方のプライマーを Cy5 標識し，これを用いて液滴 PCR を行った．テンプレート DNA を磁気ビーズが共封入される液滴からは Cy5 標識された磁気ビーズが得られた．

(B) 対照実験として，何も表面に提示しない磁気ビーズを用いた．

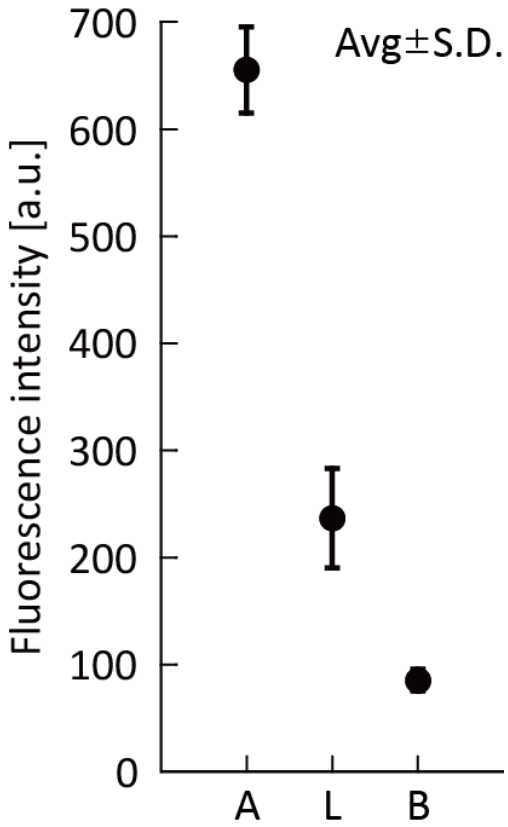

Fig. 3.5　Cy5 の蛍光強度に基づく液滴 PCR の評価

図中 A・L・B は **Fig. 3.4** の A・L・B に対応する．液滴 PCR によって得られた磁気ビーズは蛍光のないもののと，蛍光のあるものの 2 つの分布が得られたが，ここでは蛍光があった方の分布のみを示した．*N*>10.

第 4 章　同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイ系の構築

4.1　序文

本章では，ヒト由来の GPCR を発現させた出芽酵母に対して，同一液滴内でリガンド合成及びリガンドアッセイを行う系を構築した．

出芽酵母の生活環を **Fig. 4.1** に示す［44, 45］．出芽酵母には，一倍体世代と二倍体世代が存在し，一倍体世代には 2 種類の接合型（性）a 型及びα型の 2 種の細胞がある．一倍体世代の細胞は窒素源が枯渇していない環境においては，互いの細胞と接合することで二倍体世代に移行する性質を持つ．この際，互いの細胞を感知するために両細胞は性フェロモンである a 接合因子（a-factor）あるいはα接合因子（α-factor）を発する．この性フェロモンの受容体が，出芽酵母に唯一存在する内在性 GPCR（a 型：Ste3，α型：Ste2）である．受容したシグナルは，G タンパク質を経由して細胞内の MAPK カスケードを経て，下流のシグナル伝達経路を伝わる．最終的に，核内に存在する接合に必要な遺伝子の転写が活性化され接合が起こる［46–48］．従って，一倍体世代での生活を行う限りにおいては，内在性 GPCR は生存に必須ではない．従って酵母細胞の内在性 GPCR を標的 GPCR に置き換えると共に，GPCR からのシグナルを受け取る Gαタンパク質の C 末端側を，標的 GPCR が発現している生

物種の Gαタンパク質の C 末端側と同じにしたキメラ Gαタンパク質とすれば，内在性のシグナル伝達経路を利用してリガンドアッセイが可能となる．

また，酵母細胞の細胞内伝達経路の一部を遺伝子工学的に改変し，蛍光タンパク質をコードする遺伝子（レポーター遺伝子）を組み込むことで，ヒト GPCR のリガンドを受容すると蛍光タンパク質が発現するようになるため，リガンド結合のシグナルが伝わったことが，細胞の放つ蛍光で確認できるようになる［29, 49–51］．本章では，ヒトのホルモンであるソマトスタチン及びその受容体であるソマトスタチン受容体をモデルに実験を行った．ソマトスタチン受容体には 1 から 5 までのサブタイプが知られているが，本研究ではヒトの多くの臓器に発現しているサブタイプ 2（SSTR2）を用いた［52］（**Fig. 4.2**）．

ソマトスタチンは，脳の視床下部・膵臓のランゲルハンス島・消化管の内分泌細胞などから分泌され，成長ホルモンの抑制，グルカゴンの産生・分泌抑制，胃液分泌抑制に寄与しており，分泌過剰によって，先端巨大症・下垂体性巨人症などを発症する［53–56］．また，アルツハイマー病との関連性も報告されている［57］．構造は，14 アミノ酸からなるペプチドで，3 番目と 14 番目のシステインがジスルフィド結合でつながった環状ペプチドである［58, 59］（**Fig. 4.3**）．

本章では，無細胞転写翻訳系の環境下で，既成ソマトスタチンに対するリガンドアッセイによってソマトスタチン受容体を発現させた酵母が正しくリガンド応答を示す条件を検討した．続いて液滴内でリガンド合成・リガンドアッセイが行えることを確認し，同一液滴内リガンド合成・リガンドアッセイが可能な系を確立した．無細胞転写翻訳系は，市販の PURE system である PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit を用いた．PURE system は，再構成型無細胞タンパク質合成系で，転写・翻訳・エネルギー再生に必要なタンパク質，リボソームを個別に精製した後，アミノ酸，NTP などと混合した合成系である［64］．反応液に目的のタンパク質をコードする DNA を添加することで，タンパク質を合成することができる．また，精製した因子を混合した反応液を使用するため，組成を自由に調節でき，翻訳に関係のない

タンパク質をほとんど含まない．このため，IVC 法に適している無細胞転写翻訳系であると言える．

4.2 材料及び実験方法

4.2.1 使用した試薬・機器

試薬

2-Hydroxy-3-morpholinopropanesulfonic acid（MOPSO）	DOJINDO
Bacto Agar	BD Biosciences
(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane	Gelest
KOD -plus-	東洋紡
Nuclease-free water	QIAGEN
Poly(dimethylsiloxane)	東レダウコーニング
Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate（Tween 80）	東京化成
PURExpress Disulfide Bond Enhancer	NEW ENGLAND BioLabs
PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit	NEW ENGLAND BioLabs
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
Sorbitan monooleate（Span 80）	東京化成
Somatostatin	Merck Millipore, Calbiochem
Triton X-100	ナカライテスク
Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	BD Biosciences
ミネラルオイル	Sigma-Aldrich

その他の試薬は，和光純薬試薬から購入した.

器具・機器

ガラスベースディッシュ（35 mm/Glass 12 ϕ）	IWAKI
カバーガラス（24×40 mm，thickness No.1）	松浪ガラス
高圧蒸気滅菌器（BS-245）	トミー精工
恒温撹拌機（Thermomixer comfort）	Eppendorf
恒温振盪培養機（BioShaker BR-40LF）	タイテック
恒温培養器	Panasonic
サーマルサイクラー（PTC-200 Peltier Thermal Cycler）	MJ RESEARCH
微量高速冷却遠心機（MX-300）	トミー精工
分光光度計（BioPhotometer）	Eppendorf
強制循環式定温恒温器（SSSF-111）	いすゞ制作所

顕微鏡システム（液滴作製用）

倒立顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（UApo/340 20x）	オリンパス
高速カメラ（LRH2500XE）	デジモ
電空レギュレーター（ETR010）	コガネイ
DA 変換ボード（PEX-340416）	Interface
AD 変換ボード（PEX-321216）	Interface
コンプレッサ（DPP-AYAD）	コガネイ
エアタンク（DPT-T18-V）	コガネイ

顕微鏡システム（液滴内蛍光観察用）

倒立型顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（PlanApo Oil 60x）	オリンパス
488 nm レーザー（Sphire488LP-75）	Coherent
ダイクロイックミラー（505DRLP）	Omega optical
エミッションフィルター（FF01-535/30-25）	Semrock
EM-CCD カメラ（C9100-13）	浜松ホトニクス
外部循環付恒温水槽（ZL-100）	タイテック

4.2.2 圧縮空気を用いた液滴の作製

液滴は，第 2 章に示した方法で作製した．オイル溶液の組成は，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 とした．

4.2.3 使用した出芽酵母とその培養

本章では IMFD-72ZsD（*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sst2Δ::AUR1-C ste2Δ::LEU2 fig1Δ::ZsGreen his3Δ::*P_{FIG1}*-ZsGreen far1Δ gpa1Δ::*G_{i3}*tp*）にプラスミド pGK421-SSTR2（Yeast 2μ ori, *MET15* marker, *PGK1* promoter, hSSTR2 fusion expression）が取り込まれた形質転換体 IMFD-72ZsD/pGK421-SSTR2 を用いた［52］．ソマトスタチン受容体（SSTR2）はマルチコピー型のプラスミドから発現し，ZsGreen はゲノムに組み込まれた FIG1 プロモーターを介して発現する．

菌体の培養は以下の方法で行った．出芽酵母を培養する SD 選択培地は，次のようにして作製した．まず，0.67% (w/v) Yeast Nitrogen Base without Amino Acids，2% (w/v) D-Glucose を

含む溶液を調製し，オートクレーブしたものを SD 最少培地とした．SD 最少培地に，フィルタ滅菌した L-ヒスチジン，ウラシルを各 20 mg/L，L-ロイシンを 60 mg/L の最終濃度になるよう添加し SD 選択培地を作製した．この SD 選択培地に IMFD-72ZsD/pGK421-SSTR2 を植菌し，30˚C，150 rpm で一晩振盪培養を行った．この培養液を別の SD 選択培地 51.5 mL に OD_{600} が 0.03 になるように植菌し，再度 30˚C, 150 rpm で一晩振盪培養した．培養液を遠心し（3,000 rpm, 5 min，室温），上清を捨て 25 mL の滅菌水に懸濁し，同条件で再び遠心した．上清を捨て 200 μL の滅菌水に懸濁し，OD_{600} を測定し，OD_{600} が 200（1.25×10^7 cells/mL）になるように滅菌水で調製した．

4.2.4 無細胞転写翻訳系環境に近い緩衝液の調製

無細胞転写翻訳系の環境は，細胞にとって必ずしも生育しやすい環境ではない．そのため，酵母のリガンド応答が通常行われるリガンドアッセイと比べて著しく異なる可能性が考えられた．そこでまず，無細胞タンパク質合成系の環境でもリガンドアッセイが可能かどうかを非液滴環境で確認することにした．PURE system の緩衝液成分は，50 mM HEPES-KOH（pH 7.6），100 mM L-グルタミン酸カリウム，13 mM 酢酸マグネシウムである［62］．そこで，これらを最終濃度の 10 倍濃度で含む溶液を調製した．以後，この溶液を「10x PURE 緩衝液」と呼ぶ．

4.2.5 非液滴環境下での既成ソマトスタチンによるリガンドアッセイとその観察

既成ソマトスタチンを用いて，非液滴環境において酵母が正しくリガンド応答を示すかを調べ，濃度とそれに対応する蛍光強度について観察した．ソマトスタチンは滅菌水に溶解させ，500 μM としたものを適宜希釈して用いた．リガンドアッセイにはこのソマトスタチンを最終濃度で 0–10 μM 含む，**Table 4.1** に示すアッセイミックスを用いた．アッセイミッ

クスは，酵母細胞を恵与していただいた神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の近藤明彦教授，石井純准教授らのアッセイ法［30］を参考に，緩衝液として MOPSO-NaOH 緩衝液（pH 7.1）を加えた．アッセイミックスを恒温撹拌機（Thermomixer comfort）にて，30˚C, 950 rpm で 4 時間振盪撹拌した．振盪撹拌したアッセイミックスをスライドガラス上にのせて観察した．観察溶液の蒸発を防ぐため，アッセイミックス 5 µL にカバーガラスをのせ，カバーガラス周囲をマニキュアで封をした．顕微鏡は倒立型顕微鏡（IX-71），対物レンズは油浸レンズ（PlanApo Oil 60x）を用いた．488 nm のレーザー光（Sphire488LP-75）は投光管を通り，顕微鏡のターレット内に設置したダイクロイックミラー（505DRLP）で反射後，対物レンズを通過することで試料に照射した．試料からの蛍光は対物レンズで集光し，ダイクロイックミラー，エミッションフィルター（FF01-535/30-25）通過後，EM-CCD カメラ（C9100-13）を用いて検出した．観察は，まずハロゲンランプを照射し，液滴を確認して明視野像を取得した．次に，レーザー光を照射し蛍光像を取得した．レーザー強度は，対物レンズ出口の位置で 700 µW であった．明視野像，蛍光像共に露光時間 200 ms で 1 フレーム撮影により取得した．

Table 4.1　既成ソマトスタチンに対するアッセイミックス組成（単位：μL）

	A	B	C
10x SD 最少培地	5	0	5
10x PURE 緩衝液	-	5	5
100x L-ロイシン	0.5	0.5	0.5
100x L-ヒスチジン	0.5	0.5	0.5
100x ウラシル	0.5	0.5	0.5
2x MOPSO	25	25	25
Yeast (OD_{600}=40)	5	5	5
ソマトスタチン	5	5	5
Milli-Q	8.5	8.5	8.5
Total	50	50	50

4.2.6　ソマトスタチン合成用テンプレート DNA 提示ビーズの作製

ソマトスタチンを合成する DNA は，第 3 章 3.2.3 節に示した方法で作製した．この DNA を第 3 章 3.2.6 節と同様の方法で磁気ビーズに提示した．磁気ビーズへの提示 DNA 分子数は，DNA 濃度とビーズの個数から，1 ビーズあたり約 2.5×10^4 と見積もった．

4.2.7　α-factor 合成用テンプレート DNA 提示ビーズの作製

対照実験として，酵母細胞の内在性ペプチドリガンドである，α-factor［63］を合成する DNA を作製した．α-factor をコードする DNA 配列（**Fig. 4.4**）を設計し，IDT 社にて人工合成し，4.2.6 節と同様の方法で磁気ビーズ上に提示した．

4.2.8　液滴内のリガンド合成とリガンドアッセイ

4.2.6 節及び 4.2.7 節で作製した DNA 提示磁気ビーズ（DNA 提示数はいずれも 1 ビーズあたり~2.5x10^4 分子），及び DNA を何も提示しない磁気ビーズを用いて，**Table 4.2** に示す溶液組成の水溶液で液滴を作製した．ソマトスタチンは分子内にジスルフィド結合を持つので，この結合を形成させるため PURExpress Disulfide Bond Enhancer（以下 PURExpress DBE）を用いた．液滴を回収後，サーマルサイクラーを用いてリガンド合成及びリガンドアッセイを行った．条件は，37°C で 4 時間インキュベーション後，30°C で 4 時間インキュベーションする方法と，30°C で 8 時間インキュベーションする方法の 2 通りで行った．37°C，4 時間はタンパク質合成とジスルフィド結合を形成するのに最適とされる温度及び必要とされる時間である．また 30°C，4 時間はリガンドアッセイに最適とされる時間である．得られた液滴の観察は，第 2 章 2.2.5 節に示した方法と同様の方法で観察，データを取得した．

Table 4.2　リガンド合成・リガンドアッセイ液滴の水溶液組成（単位：μL）

PURExpress Solution A	4.0
PURExpress Solution B*	3.0
PURExpress DBE Solution 1	0.5
PURExpress DBE Solution 2	0.5
DNA 提示ビーズ	1.0
Yeast (OD_{600}=200)	1.0
10x SD 最少培地	1.0
33.3x Leu, His, Ura 混合液	0.5
Total	11.5

* PURExpress Solution B 液は転写・翻訳因子を含む．そのため，液滴に封入する前に合成が始まらないよう他の全ての溶液を加えてから最後に添加した．

4.2.9　データ解析

取得した画像を TIFF 形式に変換した後, ImageJ を用いて解析を行った. 液滴内の酵母は, まず明視野像を用いて酵母細胞を ROI で囲み，それを蛍光像に重ね合わせ，ROI 内部の蛍光強度を測定した．酵母細胞近傍領域を ROI で囲み，ROI 内部の蛍光強度を測定し，値の差分を真の蛍光強度とした．データの階級化及びフィッティングは，KaleidaGraph を用いて行った.

4.3　実験結果及び考察

4.3.1　非液滴環境下での既成ソマトスタチンによるリガンドアッセイ

リガンドアッセイ用培地（**Table 4.1（A)**)，PURE 緩衝液（**Table 4.1（B)**)，PURE 緩衝液にリガンドアッセイ用培地と同濃度となる SD 最少培地を加えた溶液（**Table 4.1（C)**）を用いて，リガンドアッセイを行った．ソマトスタチンは，最終濃度が 0, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 nM となるように添加した．その結果，リガンドアッセイ用培地においては，ソマトスタチン濃度増加に伴い，酵母の蛍光強度が上昇した（**Fig. 4.5，赤**）が，PURE 緩衝液のみでは蛍光強度がほとんど変化しなかった（**Fig. 4.5，青**）．そこで，条件を検討し PURE 緩衝液に SD 最少培地を加えた溶液では，リガンドアッセイ用培地と同程度のリガンド濃度依存的応答が得られた（**Fig. 4.5，緑**）．この結果から，無細胞転写翻訳系を用いる場合には，SD 選択培地を加えて実験を行うこととした.

4.3.2　出芽酵母の添加による無細胞タンパク質合成系への影響の評価

無細胞タンパク質合成系とSSTをコードするDNAを封入すると共に,酵母細胞の濃度を,酵母の封入される液滴と,封入されない液滴が存在するように調整し,両方の液滴を同時に作製した.インキュベーションを行ったあと,作製した液滴が壊れず観察できるよう,細胞観察に用いられるガラスベースディッシュを用いて液滴を広げ観察した.インキュベーションの設定を37˚Cで4時間のあと30˚Cで4時間にした場合には,酵母細胞は自家蛍光のみが確認された.インキュベーションを37˚Cで行ったため,酵母細胞にアッセイができなくなる問題が生じたと考えられる.インキュベーションを30˚Cで続けた場合には,**Fig. 4.6**に見られるように,SSTをコードするDNAを提示したビーズと共封入される酵母細胞でのみ強い蛍光が確認された(**Fig. 4.6 a, 左の液滴**).一方で,酵母内在性リガンドであるα-factorをコードするDNAを提示したビーズと共封入した酵母細胞(**Fig. 4.6 b, 右の液滴**)では自家蛍光以上の蛍光が確認されなかった.これらのデータを解析した結果,SSTをコードするDNAを提示したビーズは,酵母内在性リガンドであるα-factorをコードするDNAを提示したビーズと共封入した酵母細胞や,磁気ビーズを含まない液滴の酵母細胞の結果と比較して,10倍以上の蛍光を放つことが確認された(**Fig. 4.6 c**).

この結果から,1. ソマトスタチンが液滴内で合成された後,他の液滴に移動することなく留まり続けること,2 .合成されたソマトスタチンが同一液滴内に存在するSSTR2発現酵母のSSTR2に作動し,細胞内シグナル伝達が行われたこと,3. SSTR2発現酵母はリガンド特異的に蛍光を放ち,他のGPCR発現による偽陽性の問題が起きないことが示唆され,同一液滴内でのリガンド合成・リガンドアッセイが可能であることが確認された.

4.4　小括

ヒトソマトスタチン受容体を発現する酵母は，無細胞タンパク質合成系に近い環境では SD 最少培地を加えることで，リガンド濃度依存的なリガンド応答を示すことが明らかになった．また，液滴内におけるリガンド合成とリガンド応答は，リガンドとなる SST をコードする DNA を提示したビーズと共封入されている場合にのみ酵母が蛍光を放つことが示された．以上から，同一液滴内でのリガンド合成・リガンドアッセイが有効に行えることが示された．

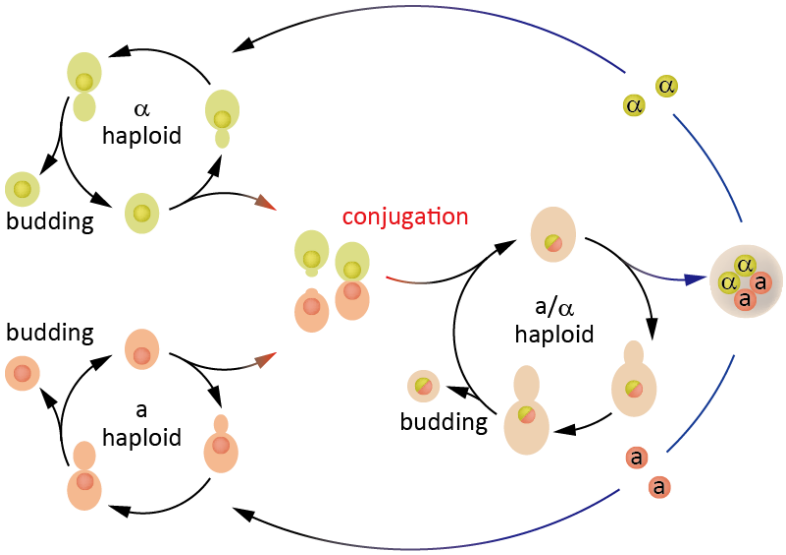

Fig. 4.1　出芽酵母の生活環

一倍体世代は出芽で増殖する方法が主であるが，窒素源が豊富な条件では互いの細胞が接合（conjugation）し，二倍体世代に移行する．この際に互いの性フェロモンを受容するために存在するのが唯一の内在性 GPCR である Ste2/Ste3 である．出芽によって増殖する限りにおいてはこの GPCR は生存に関与しない．図は［44, 45］を参考に作成．

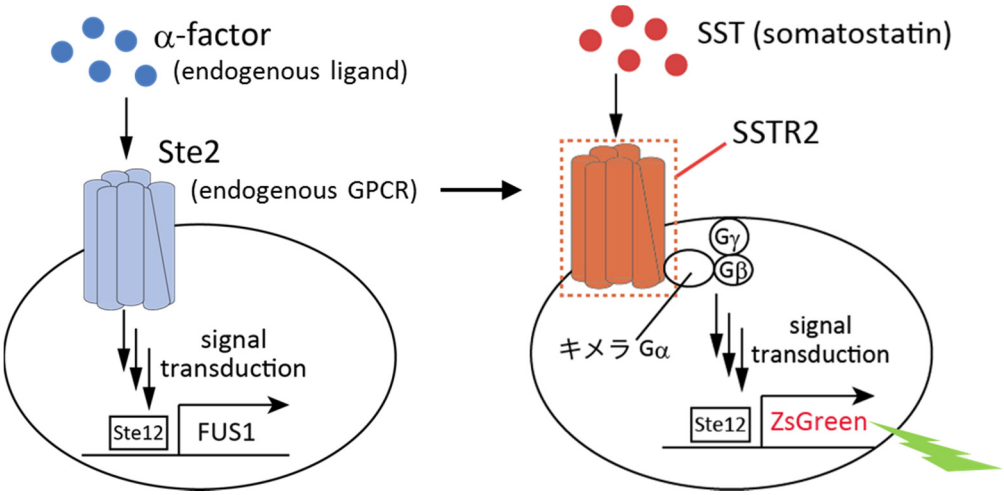

Fig. 4.2　内在性 GPCR をヒト SSTR2 に置換した酵母細胞の概要

内在性 GPCR である Ste2 をヒトの GPCR である SSTR2 に置換し，Gαタンパク質の C 末端領域（GPCR と相互作用する）をヒト型の配列としたキメラ Gαタンパク質とすることで SSTR2 のリガンドである SST が結合すると，細胞内にシグナルが流れる．細胞内伝達経路の最後は接合に必要な遺伝子の代わりにレポーターである ZsGreen の遺伝子が発現するように改変されており，SST が結合し細胞内にシグナルが流れると，ZsGreen が細胞内で合成され，蛍光を放つ．

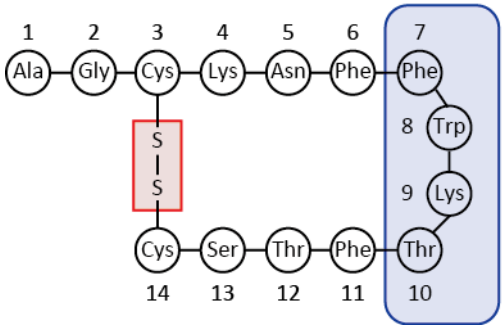

Fig. 4.3　ソマトスタチンの構造

ソマトスタチンは 3 番目と 14 番目の Cys 残基がジスルフィド結合した環状ペプチドである．サンドスタチンの研究から，生理活性には図中に青で示したソマトスタチンにおける 7-10 番目のアミノ酸配列（Phe-Trp-Lys-Thr）及び赤で示したジスルフィド結合重要であることがわかっている［60, 61］.

GTAAAACGAC GGCCAGTTTA TCTAGTCAGC TTGATTCTAG CTGATCGTGG

ACCGGAAGGT GAGCCAGTGA GTTGATTGCA GTCCAGTTAC GCTGGAGTCT

GAGGCTCGTC CTGAATGATA TGCGGCCTC**G CGAATTAATA CGACTCACTA**

TAGGGCTTAA GTATAAGGAG GAAAAAATAT GTGGCATTGG TTGCAGTTAA

AACCCGGCCA ACCAATGTAC TAATTACTAG CATAACCCCT CTCTAATCGG

AGGGGTTTGC GCGTGATCTT ACGGCATTAT ACGTATGATC GGTCCACGAT

CAGCTAGATT ATCTAGTCAG CTTGATGTCA TAGCTGTTTC CTGAGGC

Fig. 4.4　α-factor 合成用テンプレート DNA の配列

太字部分が設計した DNA 配列で，太字以外の部分は合成したプラスミド由来の配列を示す．青字部分は T7 プロモーター配列，赤字部分はリボソーム結合部位（Shine-Dalgarno 配列），緑字部分はα-factor をコードする遺伝子配列．無細胞転写翻訳系（PURE system）での合成には開始コドン（ATG）が必要なため，N 末端にメチオニンが付加されたα-factor が合成される．mRNA の分解を抑制するため，3’ UTR は 2 次構造を形成するよう設計した（下線部の配列が相補的 2 本鎖を形成する）.

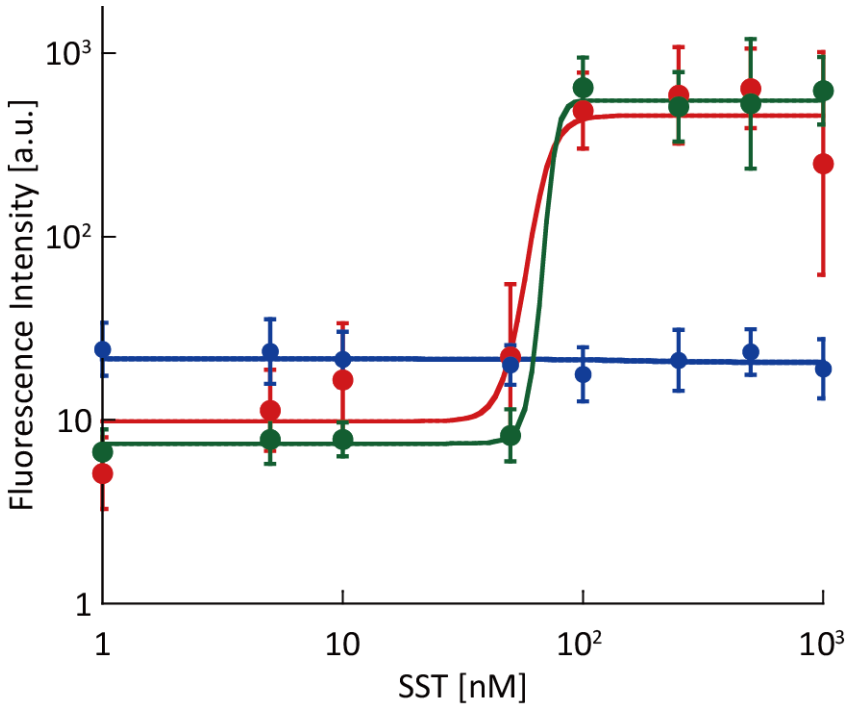

Fig. 4.5　既成ソマトスタチンによるリガンドアッセイ結果

横軸にソマトスタチン濃度（対数），縦軸に蛍光強度（対数）を示す．リガンドアッセイ用培地（赤）では，ソマトスタチン濃度依存的に蛍光強度が上昇した．PURE 緩衝液のみのアッセイミックス（青）では，リガンド濃度を増大させても蛍光強度は全く上昇しなかった．これに SD 最少培地を加えたアッセイミックスでは，リガンド濃度依存的に蛍光強度が上昇し，リガンドアッセイ用培地に近い応答となった（緑）．エラーバーは，標準偏差（S.D.）を示す．いずれの実験も N>50.

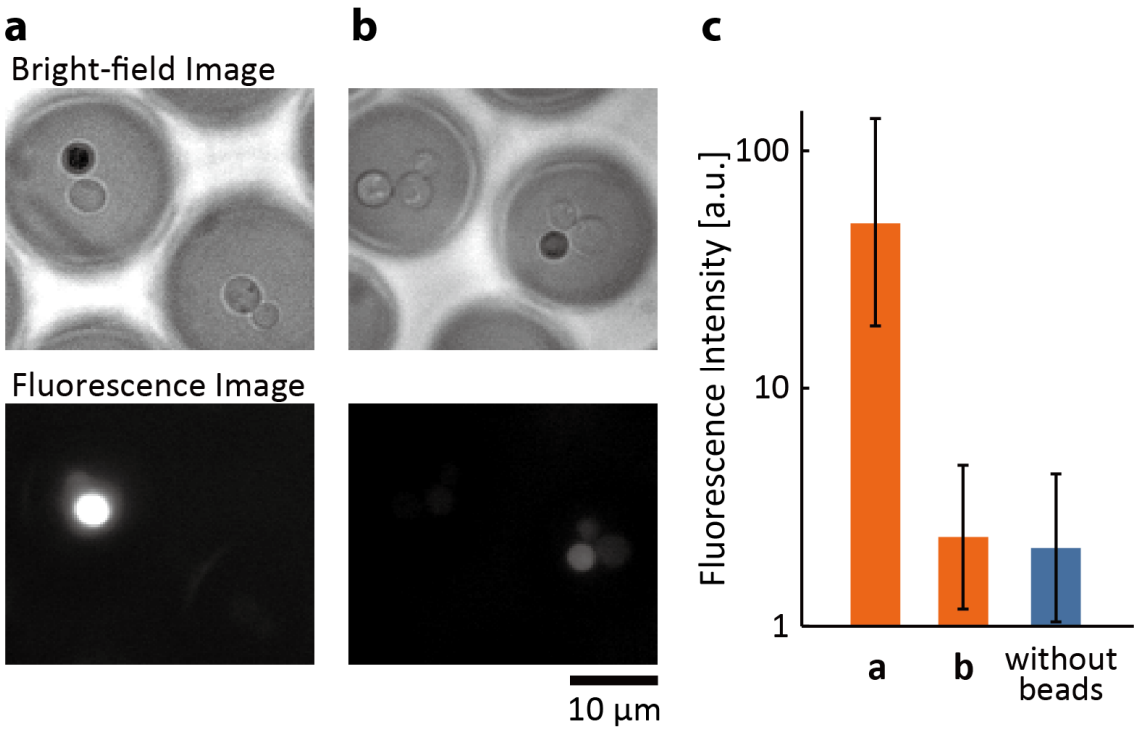

Fig. 4.6　液滴内リガンド合成・リガンドアッセイの結果

(a) SST をコードする DNA を提示した磁気ビーズと共封入した酵母細胞の顕微鏡像．明視野像に見える 2 つの液滴のうち，左の液滴には磁気ビーズと酵母細胞が共封入されているが，右側の液滴は酵母細胞のみが封入されていることが確認できる．蛍光像では，磁気ビーズと共封入されている酵母細胞のみに蛍光が認められる．

(b) α-factor をコードする DNA を提示した磁気ビーズと共封入した酵母細胞の顕微鏡像．明視野像に見える 2 つの液滴のうち，右の液滴には磁気ビーズと酵母細胞が共封入されているが，左側の液滴は酵母細胞のみが封入されていることが確認できる．いずれの酵母も自家蛍光の蛍光のみが認められる．

(c) **(a),(b)**で得られた顕微鏡像をもとに解析した結果．SST をコードする DNA と共封入されている場合にのみ，それ以外の場合の 10 倍以上の蛍光強度が確認された．

第 5 章　液滴回収と DNA 増幅

5.1　序文

作製する液滴が非常に多い（$>10^5$）ため，全ての液滴を 1 つ 1 つ確認して回収するのは多大な時間を要するだけでなく，青色光を長時間照射されることによって酵母細胞への光毒性などが生じ，偽陽性のシグナルが増えることも考えられる．そこで，本システムでは，液滴ソーティングデバイスを用いた高速なスクリーニングを 1 段階目に用いることで，この問題を解決することにした．本章では，作製した液滴のうち，磁気ビーズと蛍光を放つ酵母細胞を共に封入する液滴を，2 段階の液滴の回収方法について述べる．また，回収された液滴から DNA を増幅させ配列を決定する手法について述べる．

5.2　材料及び実験方法

5.2.1　使用した試薬・機器

試薬

100 bp DNA Ladder　　TAKARA

2-Hydroxy-3-morpholinopropanesulfonic acid（MOPSO）	DOJINDO
Bacto Agar	BD Biosciences
Ex Taq Hot Start Version	TAKARA
(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane	Gelest
Nuclease-free water	QIAGEN
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
Poly(dimethylsiloxane)	東レダウコーニング
Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate（Tween 80）	東京化成
Sorbitan monooleate（Span 80）	東京化成
STAR Agarose Powder	理科研
SYBR Safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100	ナカライテスク
Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	BD Biosciences
ミネラルオイル	Sigma-Aldrich

その他の試薬は，和光純薬試薬から購入した.

器具・機器

ガラスベースディッシュ（35 mm/Glass 12 ϕ）	IWAKI
カバーガラス（24×40 mm，thickness No.1）	松浪ガラス
高圧蒸気滅菌器（BS-245）	トミー精工
恒温撹拌機（Thermomixer comfort）	Eppendorf
恒温振盪培養機（BioShaker BR-40LF）	タイテック
恒温培養器（MIR-153）	Sanyo
サーマルサイクラー（PTC-200 Peltier Thermal Cycler）	MJ RESEARCH

微量高速冷却遠心機（MX-300）	トミー精工
分光光度計（BioPhotometer）	Eppendorf
強制循環式定温恒温器（SSSF-111）	いすゞ制作所
液滴ソーティングデバイス（On-chip Sort）	オンチップ・バイオテクノロジーズ

顕微鏡システム（液滴作製用）

倒立顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（UApo/340 20x）	オリンパス
高速カメラ（LRH2500XE）	デジモ
電空レギュレーター（ETR010）	コガネイ
DA 変換ボード（PEX-340416）	Interface
AD 変換ボード（PEX-321216）	Interface
コンプレッサ（DPP-AYAD）	コガネイ
エアタンク（DPT-T18-V）	コガネイ

顕微鏡システム（液滴観察・回収用）

倒立型顕微鏡（IX-71）	オリンパス
キセノンランプ（U-LH75XEAPO）	オリンパス
対物レンズ（UPlanApo 40x/1.00 NA Oil Iris）	オリンパス
Excitation filter（FF01-472/30-25）	Semrock
Dichroic mirror（Q505LP）	Chroma Technology
マイクロマニピュレーター（Micromanipulator 5171）	Eppendorf
マイクロインジェクター（Cell Tram Vario）	Eppendorf
ガラスキャピラリー	アルテア技研

5.2.2 圧縮空気を用いた液滴の作製

液滴は，第 2 章に示した方法で作製した．オイル溶液の組成は，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 とした．

5.2.3 使用した出芽酵母とその培養

本章で用いた酵母（IMFD-72ZsD/pGK421-SSTR2）は，第 4 章 4.2.3 節で示した方法で培養した．

5.2.4 磁気ビーズ上に提示した DNA

DNA は，第 3 章 3.2.3 節で作製したものを用いた．磁気ビーズへの提示方法は，第 3 章 3.2.6 節に述べた方法を用いた．

5.2.5 液滴ソーティングデバイスを用いたスクリーニング

10^5 個以上の液滴に対して大規模なスクリーニングを行うため，液滴ソーティングデバイスを用いて第 1 段階のスクリーニングを実現した．液滴ソーティングデバイスのスクリーニングの原理図を **Fig. 5.1** に示す．上部中央から液滴を，左右からオイル溶液をマイクロ流路に流し，シース流を作製することで，液滴を流路中央に維持する．検出ポイントで，液滴の散乱光と蛍光を検出したあと，蛍光を発する液滴のみに油圧を加えて弾き，回収流路（中央左側の流路）に誘導することで分離回収を行うことができる．送液方法を改良し，1 分で ~10^5 個の液滴をスクリーニングできる手法を採用した．この手法では，蛍光を放つ酵母が含

まれていない液滴も一定数回収されてしまうが，効率的に，それ以外の液滴を除外することができる．そこで，この装置を用いて回収する液滴に対しては，1 つずつ顕微鏡下で確認しながら目的の液滴のみを回収した．

5.2.6　マイクロマニピュレーターを用いた手動回収

5.2.5 節で回収した液滴は，ガラスベースディッシュ上に移し，顕微鏡観察しながら目的の液滴を確認した．液滴内に蛍光性の酵母と磁気ビーズが共封入されている液滴に対しては，マイクロインジェクター（Cell Tram Vario）に接続したガラスキャピラリーを用いて吸い上げ回収し，予め 10–15 μL の Mineral oil を添加した PCR チューブの蓋へ移した（**Fig. 5.2**）．PCR 溶液をチューブ内に入れたあと，PCR チューブの蓋を閉じ，卓上遠心機を用いて遠心することで，オイル内に存在している液滴内の磁気ビーズは PCR 溶液中に移行した．

5.2.7　回収後の PCR 増幅による DNA の確認

5.2.5 節で回収された DNA 磁気ビーズは，通常より増幅の効率のよいとされる PCR 増幅キット（TAKARA Ex Taq Hot Start Version）を用いて増幅を行った．**Table 5.1** に PCR 溶液の組成を，**Table 5.2** に用いたプライマーの配列を示す．PCR は変性（98^{o}C，10 s），アニーリング（55 ^{o}C，30 s），伸長（72^{o}C，17 s）を 1 サイクルとし，40 サイクル行った．反応後 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い，増幅の確認を行った．

Table 5.1　回収後 PCR の溶液組成（単位：μL）

Nuclease-free water	37.75
10x Ex Taq Buffer	5
dNTP mixture	4
10 μM T7p-primer	1.5
10 μM Rev-primer	1.5
Ex Taq HS	0.25
Total	50.0

Table 5.2　回収後 PCR に用いたプライマー配列

Primer	Sequence
T7p	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'
Rev	5'-GCCTCAGGAACAGCTATGAC-3'

5.3　実験結果及び考察

Fig. 5.3 に，回収した液滴を PCR したものを泳動した結果を示す．回収した 2 つの液滴のいずれも，提示する前の DNA を同様に増幅したものと同じ位置にバンドが検出され，液滴内に封入された DNA 提示したビーズから，増幅が可能であることが示された．

10^5 程度の液滴の場合，全ての液滴を 5.2.6 節で示した顕微鏡下で観察しながらマイクロマニピュレーターを用いて回収する手法のみであれば，10 時間以上必要となるが，本章で提示した手法を用いれば，第 1 段階のスクリーニングが 10-20 秒程度，第 2 段階のマイクロマニピュレーターを用いた回収が約 1 時間以内で終了できる，第 1 段階のスクリーニングは作製液滴数を 100-1000 倍程度まで増やしても，10 時間以内で終了できることから，この

手法を用いれば，より規模の大きなライブラリに対しても適用可能な方法であると考えられる．

5.4 小括

作製する数多くの液滴から目的の液滴を回収する手法として，液滴ソーティングデバイスを用いたスクリーニングと，マイクロマニピュレーターを用いて顕微鏡下で回収する手法を組み合わせた方法を確立した．この手法を用いて回収された液滴から得られた DNA 提示ビーズを増幅できることを示した．液滴ソーティングデバイスを用いたスクリーニングは非常に高速に処理を行えるため，スクリーニングを複数回行うことで更に大規模なライブラリに対しても適用可能になると考えられる．

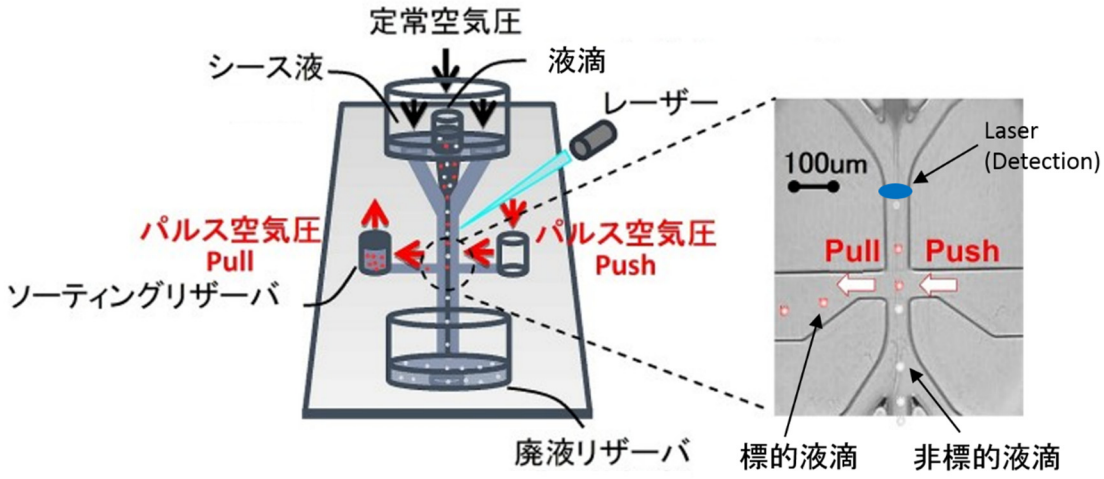

Fig. 5.1　液滴ソーティングデバイスを用いたスクリーニングの原理

（http://www.on-chip.co.jp/technology/original/より引用改変）

上部中央から液滴を，左右からオイル溶液（シース液）をマイクロ流路に流し，液滴を流路中央に維持する．検出ポイントで，液滴の散乱光と蛍光を検出したあと，蛍光を発する液滴のみに油圧を加えて弾き，回収流路（中央左側の流路）に誘導することで分離回収を行う．

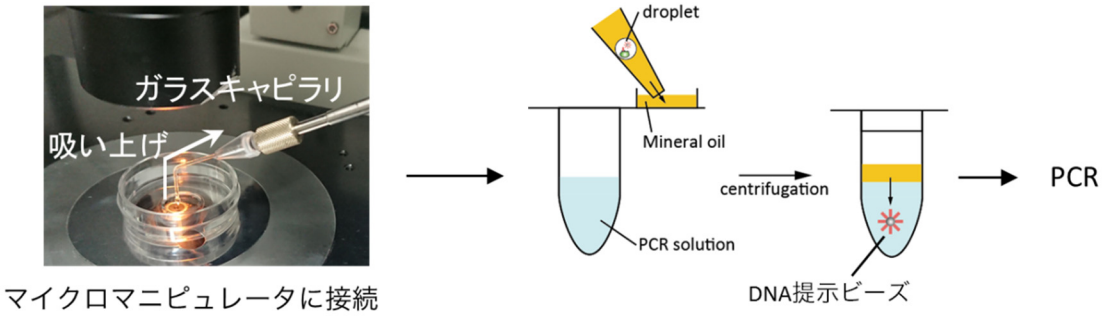

Fig. 5.2　マイクロマニピュレーターを用いた手動回収方法

マイクロマニピュレーターを用いて，ガラスキャピラリーを動かす．顕微鏡下，目的の液滴が見つかれば回収し，予めミネラルオイルを充填した PCR チューブの蓋に排出する．PCR 溶液を入れた後，蓋を閉じて遠心すれば，DNA 提示ビーズは比重が大きいため，PCR 溶液中に移動する．この溶液を用いて PCR を行い，回収した液滴内の DNA を増幅する．

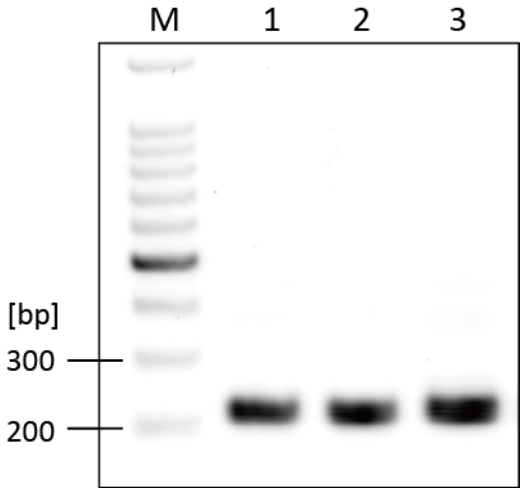

Fig. 5.3　回収した液滴の PCR 結果

M は 100 bp の分子量マーカーを示す．レーン 1，レーン 2 は液滴を回収し増幅した結果．レーン 3 は，用いた DNA を **Table 5.2** に示すプライマー配列で増幅した結果．レーン 1-3 のいずれも同じ位置にバンドが認められる．

第 6 章　構築した系の概念実証実験

6.1　序文

前章までで確立した基盤技術を用いて，本章では概念実証実験を行った．実証実験のモデルケースとして，ヒトソマトスタチン受容体（SSTR2）発現酵母の系を用いた．内在性リガンドであるソマトスタチンを元に，ライブラリを構築し実証実験を行った．

6.2　材料及び実験方法

6.2.1　使用した試薬・機器

試薬

100 bp DNA Ladder	TAKARA
Bacto Agar	BD Biosciences
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Dual-biotin-F1 primer	Integrated DNA Technologies
Dynabeads M270 streptavidin	Thermo Fisher Scientific
Ex Taq Hot Start Version	TAKARA
2-Hydroxy-3-morpholinopropanesulfonic acid（MOPSO）	DOJINDO

(Heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)dimethylchlorosilane	Gelest
KOD -plus-	東洋紡
Ligation high	東洋紡
Nuclease-free water	QIAGEN
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin Plasmid EasyPure	MACHEREY-NAGEL
Poly(dimethylsiloxane)	東レダウコーニング
Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate（Tween 20）	東京化成
Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate（Tween 80）	東京化成
Primers	Sigma-Aldrich
PURExpress Disulfide Bond Enhancer	NEW ENGLAND BioLabs
PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit	NEW ENGLAND BioLabs
Sorbitan monooleate（Span 80）	東京化成
STAR Agarose Powder	理科研
SYBR safe DNA gel stain	Thermo Fisher Scientific
T4 polynucleotide kinase	東洋紡
Triton X-100	ナカライテスク
Yeast Nitrogen Base without Amino Acids	BD Biosciences
ミネラルオイル	Sigma-Aldrich

その他の試薬は，和光純薬試薬から購入した.

器具・機器

ガラスベースディッシュ（35 mm/Glass 12 ϕ）	IWAKI
高圧蒸気滅菌器（BS-245）	トミー精工

恒温撹拌機（Thermomixer comfort）	Eppendorf
恒温振盪培養機（BioShaker BR-40LF）	タイテック
恒温培養器（MIR-153）	Panasonic
サーマルサイクラー（PTC-200 Peltier Thermal Cycler）	MJ RESEARCH
微量高速冷却遠心機（MX-300）	トミー精工
分光光度計（BioPhotometer）	Eppendorf
強制循環式定温恒温器（SSSF-111）	いすゞ制作所
超微量分光光度計（NanoDrop）	Thermo Fisher Scientific
液滴ソーティングデバイス（On-chip Sort）	オンチップ・バイオテクノロジーズ

顕微鏡システム（液滴作製用）

倒立顕微鏡（IX-71）	オリンパス
超安定ステージ（Model KS-O）	中興社製作所
対物レンズ（UApo/340 20x）	オリンパス
高速カメラ（LRH2500XE）	デジモ
電空レギュレーター（ETR010）	コガネイ
DA 変換ボード（PEX-340416）	Interface
AD 変換ボード（PEX-321216）	Interface
コンプレッサ（DPP-AYAD）	コガネイ
エアタンク（DPT-T18-V）	コガネイ

顕微鏡システム（液滴観察・回収用）

倒立型顕微鏡（IX-71）	オリンパス
キセノンランプ（U-LH75XEAPO）	オリンパス
対物レンズ（UPlanApo 40x/1.00 NA Oil Iris）	オリンパス

Excitation filter（FF01-472/30-25）	Semrock
Dichroic mirror（Q505LP）	Chroma Technology
マイクロマニピュレーター（Micromanipulator 5171）	Eppendorf
マイクロインジェクター（Cell Tram Vario）	Eppendorf
ガラスキャピラリー	アルテア技研

使用した大腸菌の菌株

本章で用いた大腸菌の菌株は XL10-Gold 株 (アジレント・テクノロジー) である．以下にその遺伝子型を示す．

XL10-Gold 株：

Tet^{r}, Δ(*mcrA*)*183*, Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173*, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, Hte, [F', *proAB*, *lacI*^{q}*ZΔM15*, Tn^{10} (*Tet*^{r}), Amy, Cam^{r}]

6.2.2 圧縮空気を用いた液滴の作製

液滴は，第 2 章に示した方法で作製した．オイル溶液の組成は，95% (v/v) ミネラルオイル，4.5% (v/v) Span 80，0.45% (v/v) Tween 80，0.05% (v/v) Triton X-100 とした．

6.2.3 使用した出芽酵母とその培養

使用した酵母は，IMFD-72ZsD/pGK421-SSTR2で，第4章4.2.3節と同じ方法で培養を行った．

6.2.4 変異導入ライブラリの作製

本章で示す実証実験では，モデルペプチドとしてソマトスタチン（SST）を用いた．第 3 章 3.2.3 節で作製した SST をコードする DNA 配列を含むプラスミドを鋳型として，inverse PCR（iPCR）法［65, 66］と overlap extension PCR 法［67, 68］（**Fig. 6.1**）を用いてライブラリを作製した．鋳型のプラスミドが残ることで元の SST をコードする配列が残ると，ライブラリ中に含まれる SST をコードする配列の割合が変わり，想定している条件と異なるライブラリの条件になってしまう可能性があった．そこで，iPCR 法を用いて変異を導入する部分の塩基配列を一度削除したプラスミドを作製し，このプラスミドに対して overlap extension PCR 法を用いることで，SST をコードする DNA の割合に影響を与えない方法を用いた．

（1）iPCR による変異導入部位外配列の増幅

Table 6.1 に示す反応溶液組成で iPCR を行った．プライマーの配列を **Table 6.2** に示す．反応は，加熱（94°C，2 min）後，変性（98°C，10 s），伸長（68°C，2.1 min) を 1 サイクルとし，10 サイクル行った．

Table 6.1　iPCR 溶液組成（単位：μL）

Nuclease-free water	33.0
10× PCR Buffer for KOD -Plus-	5.0
2 mM dNTPs	5.0
25 mM $MgSO_4$	2.4
10 μM SST-Fd primer	1.5
10 μM SST-R primer	1.5
Template plasmid (1 ng/μL)	1.0
KOD -plus-	1.0
Total	50.0

Table 6.2　iPCR に用いたプライマー

Primer	Sequence
SST-R	5'-AAAAAAATTTTTGCAGCCCGCC-3'
SST-Fd	5'-TTTACCAGCTGCTAATTACTAGCATAACC-3'

（2）*Dpn* I による鋳型プラスミド消化

（1）で得られた溶液に含まれる鋳型プラスミドを消化するため，**Table 6.3** に示す反応溶液組成で 37°C，1 時間反応を行った．これをプラスミド消化液と称する．

Table 6.3　*Dpn* I による鋳型プラスミド消化反応の溶液組成（単位：μL）

iPCR 液	50
Dpn I	2
Total	52

（3）PCR 産物の self-ligation

（2）で得られたプラスミド消化液を T4 polynucleotide kinase と Ligase を用いた self-ligation 反応によってプラスミドを作製した．反応は **Table 6.4** に示す組成で，16°C，1 時間で反応を行った．得られたプラスミドを pSSTΔ7-10 と呼ぶ．

Table 6.4　self-ligation 反応溶液組成（単位：μL）

プラスミド消化液	2
Ligation high	5
T4 Polynucleotide Kinase	1
Nuclease-free water	7
Total	15

（4）形質転換と塩基配列確認

（3）で得られたプラスミドを 5 μL 用いて，大腸菌 XL10-Gold に形質転換した後，プラスミド抽出キット（NucleoSpin Plasmid EasyPure）を用いて抽出し，塩基配列を解析した（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit，**Fig. 6.2a**）．配列解析に用いたプライマーを，**Table 6.5** に示す．

Table 6.5　pSSTΔ7-10 の配列解析に用いたプライマー

Primer	Sequence
F2	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
Rev	5'-GCCTCAGGAAACAGCTATGAC-3'

（5）overlap extension PCR によるランダム変異導入

（4）で得られた pSSTΔ7-10 を鋳型とし，overlap extension PCR 法を用いてランダム変異を導入した．用いたプライマーの組み合わせと配列を **Table 6.6** に示す．まず 2 種類の PCR を **Table 6.7** に示す溶液組成で行った．反応は，加熱（94°C，2 min）後，変性（94°C，10 s），アニーリング（50°C，30 s），伸長（68°C，17 s）を 1 サイクルとし，30 サイクル行った．目的の遺伝子のみを取得するため，PCR 産物の切り出し精製を行った．まず，2%アガロースゲルで電気泳動を行ったあと，目的のバンドをカッターで切り出し 1.5 mL チューブに移した．

その後，DNA 精製キット（NucleoSpin Gel and PCR Clean-up）のプロトコルに基づき，ゲル片から DNA を精製したのち，分光光度計（NanoDrop）を用いて濃度を測定した．

Table 6.6　overlap extension PCR（1 回目）の反応溶液組成（単位：μL）

10x PCR Buffer for KOD -Plus-	5
2 mM dNTPs	5
25 mM $MgSO_4$	2
10 μM primer1	1.5
10 μM primer2	1.5
1 ng/μL pSSTΔ7-10	1
KOD -plus-	1
Nuclease-free water	33
	50

Table 6.7　overlap extension PCR（1 回目）に用いたプライマーの配列と組み合わせ

組合せ	Primer	Sequence
#1	F2	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
#1	SST-R	5'-AAAATTTTTGCAGCCCGCCATATTTTTTCC-3'
#2	F-3S	5'-GGAAAAAATATGGCGGGCTGCAAAAATTTTTTT NNSNNSNNSTTTACCAGCTGCTAATTACTAGCATAACC-3'
#2	Rev	5'-GCCTCAGGAAACAGCTATGAC-3'

F-3S のプライマーのうち下線部で示した部分がランダム変異を導入する配列となる．SST-R と F-3S の青で示した配列は相補的配列であり，この部分が重なり合う配列となる．N は A/T/G/C の任意の塩基を，S は C/G のいずれかの塩基を示す．

つづいて，精製した DNA をそれぞれ 50 ng/μL に調製し，2 回目の PCR を，外側のプライマー（**Table 6.7** の F2-primer と Rev-primer）を用いて行った．反応溶液の組成を **Table 6.8** に

示す．反応は，プライマーを入れずに調製した溶液（47 μL）を加熱（94°C，2 min）後，変性（94°C，10 s），アニーリング（50°C，30 s），伸長（68°C，20 s）を 1 サイクルとし，5 サイクル行ったあと，4°C に冷却した．つづいてこの溶液にプライマーを加えて，変性（94°C，10 s），アニーリング（50°C，30 s），伸長（68°C，30 s）を 1 サイクルとし，30 サイクル反応を行った．1 回目の PCR 後と同様の方法で，切り出し精製を行い，DNA 濃度を測定したあと，塩基配列を確認した（**Fig. 6.2b**）．

Table 6.8　overlap extension PCR（2 回目）の反応溶液組成（単位：μL）

10x KOD buffer	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO4	2
50 ng/μL template1	1
50 ng/μL template2	1
KOD -plus-	1
Nuclease-free water	32
↓	47
10 μM F2-primer	1.5
10 μM Rev-primer	1.5
Total	50

変異導入ライブラリは，SST の 8-10 番目のアミノ酸をコードする塩基配列を NNS（N は A・T・G・C のいずれかの塩基を，S は C・G のいずれかの塩基を示す）に変異して作製したライブラリである．塩基配列を NNS とすることで，終止コドンのうちの 2 つの配列（TAA, TAG）を除外できる一方，20 種類のアミノ酸は全て登場する可能性を維持した．ライブラリの大きさは $(4x4x2)^3 \sim 3x10^4$ となり，そのうち 2 つの配列（TGG AAG ACC・TGG AAG ACG，い

ずれもオリジナルの SST をコードする配列 TTT AAA ACC とは異なる）が SST をコードする配列となる．

このライブラリを用いて，**Table 6.9** に示す 3 種類の物質量比で SST をコードする DNA と混合し，第 3 章 3.2.4 節と同じ方法で液滴 PCR を行い，ライブラリ DNA を磁気ビーズ上に提示した．

Table 6.9　変異導入ライブラリと SST をコードする DNA の物質量比の組み合わせ

	変異導入ライブラリ	SST をコードする DNA
A	ライブラリのみ	（なし）
B	100	1
C	1000	1

6.2.5　液滴内リガンド合成・リガンドアッセイ

作製した DNA 提示ビーズと，培養した酵母細胞は，第 4 章 4.2.9 節と同じ方法で液滴内に封入した．封入した液滴は，第 4 章で決定したインキュベーション温度である 30 ˚C で最低 8 時間インキュベーションした．インキュベーション後，第 5 章 5.2.5-5.2.6 節に示した方法で液滴を回収した．回収した液滴は第 5 章 5.2.7 節に示した方法で増幅し，塩基配列の確認を行った（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit）．

6.3 実験結果及び考察

Table 6.9 の A-C に対応する実験の結果を以下の **Table 6.10** に示す．

Table 6.10　概念実証実験の結果

組み合わせ	作製液滴数 (内共封入数)	第 1 段階	第 2 段階	増幅できた液滴	SST をコードする配列数
A	~1x10^5 (~1x10^4)	~200	2	2	0
B	~3x10^5 (~3x10^4)	~200	4	3	2
C	~3x10^5 (~3x10^4)	~100	1	1	1

組み合わせ A-C は **Table 6.9** の A-C の組み合わせを示した．作製液滴数は，何も含まれていない液滴，磁気ビーズのみが封入された液滴，酵母細胞のみが封入された液滴，磁気ビーズと酵母細胞の両方が共封入された液滴の合計数を示す．共封入数はこのうち，磁気ビーズと酵母細胞の両方が含まれている液滴の数を示す．第 1 段階は，液滴ソーティングを用いて回収した液滴の数を示す．第 2 段階は，マイクロマニピュレーターを用いて手動で回収した液滴の個数を示す．増幅できた液滴は，最終的に回収した液滴の内，PCR をよってバンドが検出されたものを示した．

変異導入ライブラリの実験（**Table 6.10 A**）から増幅された液滴は，2 つとも多くの配列が含まれており，SST をコードする配列は決定することができなかった．先行研究［69］によれば，ライブラリの 99％以上を網羅するためには，全てのライブラリが等確率で存在する場合であってもライブラリ規模（~3x10^4）の 10-25 倍の数を試行する必要があることから，共封入数を 10^5-10^6 以上にする必要があり，この数が不足していたため，目的とする配列が得られないものと推定された．そこで，**Table 6.10 B, C** に示すように変異導入配列に対して物質量比で 100:1 あるいは 1000:1 で SST をコードする配列を混合したものを用いて実証実験を行った．ライブラリ封入数を 3x10^4 としたところ，いずれの場合も SST をコードする配列（変異導入ライブラリ配列の SST をコードする配列ではない）が得られた．ライブラリの

うちカバーされている種類は $3x10^3$ 程度であると考えられるため，100:1 では 10-30 個程度の，1000:1 では 1-3 個程度の SST の配列が得られると推定され，1000:1 では実験結果とも一致した．100:1 の結果は推定される個数よりも 1 桁程度低いが，実証実験の規模を増やすことで理論値に近い個数を検出できると考えられる．

6.4 小括

モデルケースとしてヒトソマトスタチン受容体 SSTR2 を発現する酵母を用いた系において，概念実証実験を行った．SST の 8-10 番目のアミノ酸に変異を導入した変異導入ライブラリのみの概念実証実験では，SST をコードする DNA 配列は得られなかったが，このライブラリに SST をコードする配列を 100:1 あるいは 1000:1 の物質量比で混合したものからは，SST をコードする配列が得られた．以上から，物質量比を人工的に制御した条件において，構築したシステムが機能することが示された．今回の 10-100 倍の規模で実験を行うことで実証実験に用いたライブラリの規模を全てカバーすることが可能になると考えられ，その場合変異導入配列由来の SST をコードする配列が得られると推定される．

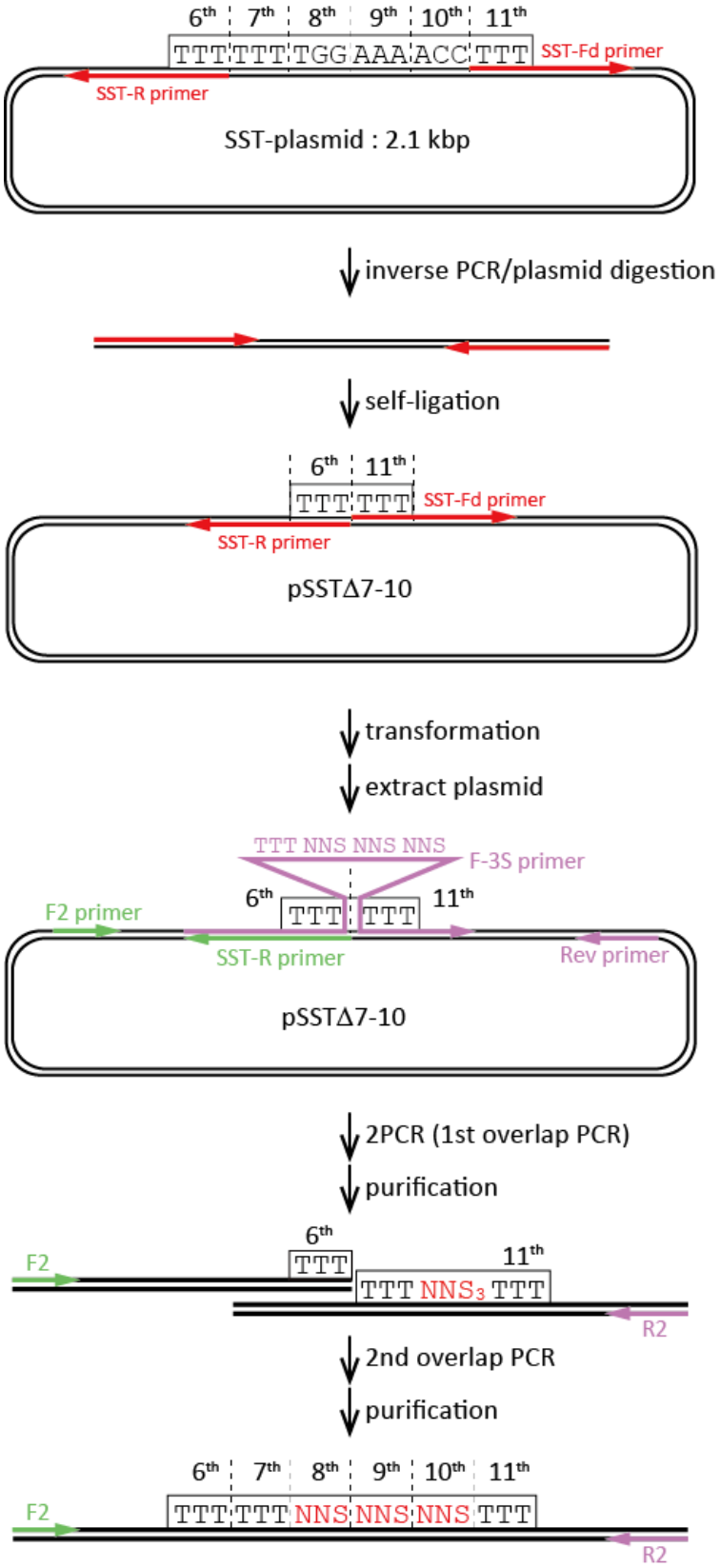

Fig. 6.1　iPCR（上）・overlap extension PCR（下）による変異導入ライブラリ作製

SST をコードする DNA を含むプラスミドのうち SST の 7-10 番目をコードする配列を含まない領域を増幅する．鋳型となるプラスミドを *Dpn I* で消化後，self-ligation 反応を行い，dsDNA を環状 DNA（pSSTΔ7-10）に戻す．これを大腸菌に形質転換し，大腸菌からプラスミドを抽出することで，元の鋳型となった SST をコードする配列を確実に除外する．このプラスミドを鋳型として，緑のプライマーセットと，紫のプライマーセットの組み合わせで PCR を行う．紫のプライマーセットには，ランダム変異の元となる NNS NNS NNS の配列を含むプライマーを用いており，これによってランダム変異が導入される．2 つの PCR によって得られる DNA は一部の配列が重複しており，これらの DNA を両方含む条件で PCR を行うと，変異が導入されたライブラリが得られる．

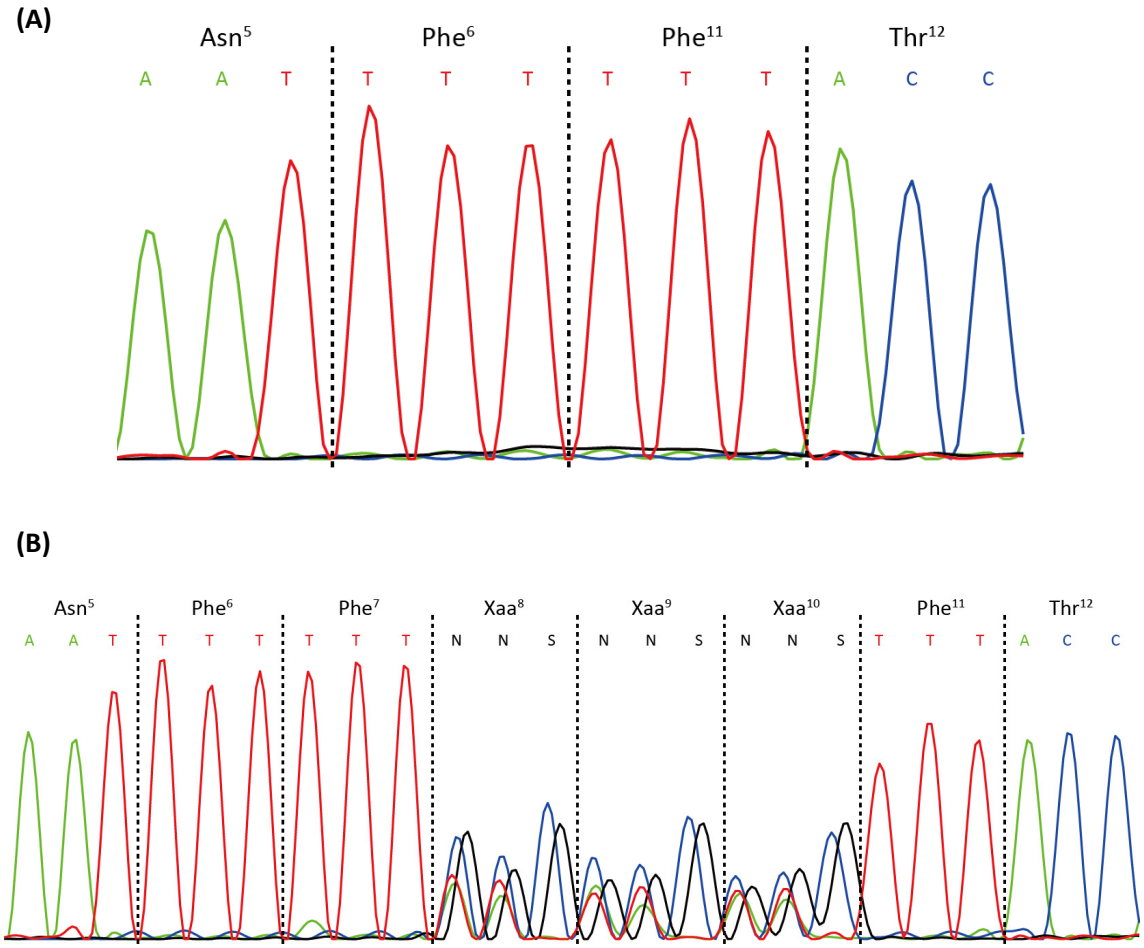

Fig. 6.2　シークエンス結果による変異導入確認結果

(A) 元となる配列から，7-10 番目のアミノ酸残基をコードする DNA 配列を削除した配列．SST をコードする配列は確認されない．

(B) **(A)** の配列を元に overlap extension PCR によってランダム変異を導入した配列．NNS の塩基配列のシグナルが正しく目的の位置に出現しており，ランダム変異導入が成功したことを示す．

第 7 章　総括および今後の展望

7.1　本研究の総括

本研究により，液滴を用いたペプチドアゴニスト創出システムが確立された．まず，必要な要素技術の確立を行った．まず，マイクロ流体デバイスを用いて均一な大きさの液滴を高速に作製可能であることを示した．報告されている液滴作製のオイル溶液の組成の中から最良とされる組成を決定した．この組成を用いて，液滴を作製する水溶液とオイル溶液を送液する圧力を調整することによって，様々な直径の液滴を作製できる中から，本システムに適した大きさの液滴を決定した．マイクロ流体デバイスを用いて，このオイル組成で液滴を作製する際，その大きさが非常に均一にできることも確認できた．

続いて，液滴内 PCR によってテンプレート遺伝子を増幅し，磁気ビーズ表面に提示させることで，少ない種類の DNA を多数提示する手法を確立した．封入する磁気ビーズや，DNA 分子数を検討し，リガンドアッセイ・リガンド応答に必要な分子数の DNA を磁気ビーズ上に提示できることを示した．

同一液滴内でのリガンド合成・リガンドアッセイが可能であることを，SSTR2 と SST をモデルケースとした系を用いて示した．リガンドアッセイを無細胞転写翻訳系で行う場合，酵母培養培地を添加することで実現し，この条件でリガンド合成とリガンドアッセイを同一液滴内で行うことができることを示した．

標的となる液滴の回収の手法として，液滴ソーティングデバイスを用いた第 1 段階のスクリーニングと，顕微鏡下マイクロマニピュレーターに接続したガラスキャピラリーを用いた手動回収の第 2 段階を組み合わせた回収手法を確立した．回収された液滴内の DNA を増幅したものを電気泳動によって確認し，回収した液滴内から正しく DNA が増幅できることを示した．

最後に, 以上で確立した要素技術を用いて, SSTR2 発現酵母と SST をモデルケースとして，本研究で考案したペプチドリガンド創出システムの実証実験を行った．SST をコードする配列の一部のアミノ酸残基を変異させ作製したライブラリのみを用いた場合には，SST をコードする配列を検出することはできなかったが, ライブラリに SST をコードする配列を 100:1, 1000:1 の物質量比で混合したものからは，SST をコードする配列を検出することができた．以上の結果から，本研究で構築したシステムが機能することが示された．

7.2 今後の展望

今回は, 10^4 程度のライブラリ分子を用いた実証実験を行ったが, 変異ライブラリから SST をコードする配列を得ることはできなかった．これは概念実証実験に用いたライブラリ分子数が少なかったためと考えられる．先行研究［68］によると，ライブラリ全数を 99%以上の確率で確認するためには，ライブラリ規模の 10-25 倍程度の数を用いなければならない．回収にかかる時間を考えると，第 l 段階のスクリーニングが 1 分以内と非常に高速であることから，この段階のスクリーニングを数多く行うことで，全ライブラリを確認でき，ライブラリの配列のみの概念実証実験においても SST をコードする配列を得られると考えられる．同様に，第 l 段階のスクリーニングの数を 10^3 回程度にまで引き上げることで，サイズが 10^8 程度のライブラリにも適用できると考えられる．これによって，標的 GPCR のよりよいペプチドアゴニスト創出に応用することができるようになると考えられる．更に規模の

大きなライブラリに対しては，本システムで構築した系を複数回用い段階的に候補を絞り込む戦略を用いることで，効率的な探索が可能になると期待される．

また，リガンドアッセイを行う液滴に，既知アゴニストを後から封入出来るようにすることができれば，本システムをアゴニストだけでなく，アンタゴニストに対しても適用可能な系に拡張することができる．今後は，液滴同士の融合や，液滴内部への溶液注入などの方法を検討することで，アンタゴニストに対するシステムを構築したい．将来的には薬のスクリーニングシステムにもこのペプチド創生システムが重要な役割を担うようになるだろう．

引用文献

[1] Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M., “Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor”, *Science*, 2000, **289**, pp. 739–745.

[2] Rasmussen S. G., Choi H. J., Rosenbaum D. M., Kobilka T. S., Thian F. S., Edwards P. C., Burghammer M., Ratnala V. R., Sanishvili R., Fischetti R. F., Schertler G. F., Weis W. I., Kobilka B. K., “Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor”, *Nature*, 2007, **450**, pp. 383–387.

[3] Vilardaga J. P., Bunemann M., Feinstein T. N., Lambert N., Nikolaev V. O., Engelhardt S., Lohse M. J., Hoffmann C., “Minireview: GPCR and G Proteins: Drug Efficacy and Activation in Live Cells“, *Mol. Endocrinol.*, 2009, **23**, pp. 590–599.

[4] Wettschureck N., Offermanns S., “Mammalian G proteins and their cell type specific functions”, *Physiol. Rev.*, 2005, **85**, pp. 1159–1204.

[5] Tao Y. X., “Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications”, *Pharmacol. Ther.*, 2006, **111**, pp. 949–973.

[6] Seifert R., Wenzel-Seifert K., “Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors”, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 2002, **366**, pp. 381–416.

[7] Rask-Andersen M., Almen M. S., Schioth H. B., ”Trends in the exploitation of novel drug targets”,

Nat. Rev. Drug Discov., 2011, **10**, pp. 579–590.

[8] Aharoni A., Griffiths A. D., Tawfik D. S., "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, pp. 210–216.

[9] Dower W. J., Mattheakis L. C., "*In vitro* selection as a powerful tool for the applied evolution of proteins and peptides", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6**, pp. 390–398.

[10] Olsen M., Iverson B., Georgiou G., "High-throughput screening of enzyme libraries", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, **11**, pp. 331–337.

[11] Lee S. Y., Choi J. H., Xu Z., "Microbial cell-surface display", *Trends Biotechnol.*, 2003, **21**, pp. 45–52.

[12] Samuelson P., Gunneriusson E., Nygren P. A., Stahl S., "Display of proteins on bacteria", *J. Biotechnol.*, 2002, **96**, pp. 129–154.

[13] Kondo A., Ueda M., "Yeast cell-surface display - applications of molecular display", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **64**, pp. 28–40.

[14] Smith G. P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", *Science*, 1985, **228**, pp. 1315–1317.

[15] Skerra A., "Engineered protein scaffolds for molecular recognition", *J. Mol. Recognit.*, 2000, **13**, pp. 167–187.

[16] Hoess R. H., "Protein design and phage display", *Chem. Rev.*, 2001, **101**, pp. 3205–3218.

[17] Nemoto N., Miyamoto-Sato E., Husimi Y., Yanagawa H., "*In vitro* virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*", *FEBS Lett.*, 1997, **414**, pp. 405–408.

[18] Roberts R. W., Szostak J. W., "RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, pp. 12297–12302.

[19] Hanes J., Pluckthun A., "*In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, pp. 4937–4942.

[20] Tawfik D. S., Griffiths A. D., “Man-made cell-like compartments for molecular evolution”, *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, pp. 652–656.

[21] Doi N., Yanagawa H., ”STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries *in vitro*”, *FEBS Lett.*, 1999, **457**, pp. 227–230.

[22] Ohuchi S., Nakano H., Yamane T., “*In vitro* method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation“, *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**, pp. 4339–4346.

[23] Bernath K., Magdassi S., Tawfik D. S., “Directed evolution of protein inhibitors of DNA-nucleases by *in vitro* compartmentalization (IVC) and nano-droplet delivery”, *J. Mol. Biol.*, 2005, **345**, pp. 1015–1026.

[24] Griffiths A. D., Tawfik D. S., “Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by *in vitro* compartmentalization”, *EMBO J.*, 2003, **22**, pp. 24–35.

[25] Johnson G. L., Dhanasekaran N., “The G-protein family and their interaction with receptors”, *Endocr. Rev.*, 1989, **10**, pp. 317–331.

[26] Zhao H., Ivic L., Otaki J. M., Hashimoto M., Mikoshiba K., Firestein S., “Functional expression of a mammalian odorant receptor”, *Science*, 1998, **279**, pp. 237–242.

[27] Radhika V., Proikas-Cezanne T., Jayaraman M., Onesime D., Ha J. H., Dhanasekaran D. N., “Chemical sensing of DNT by engineered olfactory yeast strain”, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, **3**, pp. 325–330.

[28] Dong S., Rogan S. C., Roth B. L., “Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs”, *Nat. Protoc.*, 2010, **5**, pp. 561–573.

[29] Ishii J., Tanaka T., Matsumura S., Tatematsu K., Kuroda S., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., “Yeast-based fluorescence reporter assay of G protein-coupled receptor signalling for flow cytometric screening: FAR1-disruption recovers loss of episomal plasmid caused by signalling in yeast”, *J. Biochem.*, 2008, **143**, pp. 667–674.

[30] Iguchi Y., Ishii J., Nakayama H., Ishikura A., Izawa K., Tanaka T., Ogino C., Kondo A., "Control of signalling properties of human somatostatin receptor subtype-5 by additional signal sequences on its amino-terminus in yeast", *J. Biochem.,* 2010, **147**, pp. 875–884.

[31] Klein C., Paul J. I., Sauve K., Schmidt M. M., Arcangeli L., Ransom J., Trueheart J., Manfredi J. P., Broach J. R., Murphy A. J., "Identification of surrogate agonists for the human FPRL-1 receptor by autocrine selection in yeast", *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, pp. 1334–1337.

[32] Matsuura T., Yomo T., "*In vitro* evolution of proteins", *J. Biosci. Bioeng.*, 2006, **101**, pp. 449–456.

[33] Ziemecka I., van Steijn V., Koper G. J., Rosso M., Brizard A. M., van Esch J. H., Kreutzer M. T., "Monodisperse hydrogel microspheres by forced droplet formation in aqueous two-phase systems", *Lab Chip*, 2011, **11**, pp. 620–624.

[34] Haneoka M., Shirasaki Y., Sugino H., Aoki T., Arakawa T., Ozaki K., Yoon D. H., Ishii N., Iizuka R., Shoji S., Funatsu T., "Microfluidic active sorting of DNA molecules labeled with single quantum dots using flow switching by a hydrogel sol-gel transition", *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2011, **159**, pp. 314–320.

[35] Irimia D., Mindrinos M., Russom A., Xiao W., Wilhelmy J., Wang S., Heath J. D., Kurn N., Tompkins R. G., Davis R. W., Toner M., "Genome-wide transcriptome analysis of 150 cell samples", *Integr. Biol.*, 2009, **1**, pp. 99–107.

[36] Zheng Y., Roberts R. J., "Selection of restriction endonucleases using artificial cells", *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, e83.

[37] Miller O. J., Bernath K., Agresti J. J., Amitai G., Kelly B. T., Mastrobattista E., Taly V., Magdassi S., Tawfik D. S., Griffiths A. D., "Directed evolution by *in vitro* compartmentalization", *Nat. Methods.*, 2006, **7**, pp. 561–570.

[38] Diehl F., Li M., He Y., Kinzler K. W., Vogelstein B., Dressman D., "BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions", *Nat. Methods.*, 2006, **7**, pp. 551–559.

[39] Lorenz R. M., Fiorini G. S., Jeffries G. D., Lim D. S., He M., Chiu D. T., "Simultaneous generation of

multiple aqueous droplets in a microfluidic device", *Anal. Chim. Acta.*, 2008, **2**, pp. 124–130.

[40] Dressman D., Yan H., Traverso G., Kinzler K. W., Vogelstein B., "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, pp. 8817–8822.

[41] Williams R., Peisajovich S. G., Miller O. J., Magdassi S., Tawfik D. S., Griffiths A. D., "Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR", *Nat. Methods.*, 2006, **3**, pp. 545–550.

[42] Buranda, T., Lopez, G. P., Keij, J., Harris, R., and Sklar, L. A., "Peptides, antibodies, and FRET on beads in flow cytometry: A model system using fluoresceinated and biotinylated β-endorphin", *Cytometry*, 1999, **7**, pp. 21–31.

[43] Margulies, M., et al. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature*, 2005, **437**, pp. 376–380.

[44] Herskowitz I., "Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol. Rev.*, 1988, **4**, pp. 536–553.

[45] Curt W., Steven I. R., "Plugging it in: signaling circuits and the yeast cell cycle", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1996, **8**, pp. 223–230.

[46] Bert O., Frederick R. C., "Signal transduction in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1994, **6**, pp. 836–841.

[47] King K., Dohlman H. G., Thorner J., Caron M. G., Lefkowitz R. J., "Control of yeast mating signal transduction by a mammalian β_2-adrenergic receptor and Gs α-subunit", *Science*, 1990, **250**, pp. 121–123.

[48] Ladds G., Goddard A., Davey J., "Functional analysis of heterologous GPCR signalling pathways in yeast", *Trends Biotechnol.*, 2005, **23**, pp. 367–373.

[49] Siekhaus D. E., Drubin D. G., "Spontaneous receptor-independent heterotrimeric G-protein signalling in an RGS mutant", *Nat. Cell Biol.*, 2003, **5**, pp. 231–235.

[50] Poritz M. A., Malmstrom S., Kim M. K., Rossmeissl P. J., Kamb A., "Graded mode of transcriptional

induction in yeast pheromone signalling revealed by single-cell analysis", *Yeast*, 2001, **18**, pp. 1331–1338.

[51] Ishii J., Matsumura S., Kimura S., Tatematsu K., Kuroda S., Fukuda H., Kondo A., "Quantitative and dynamic analyses of G protein-coupled receptor signaling in yeast using Fus1, enhanced green fluorescence protein (EGFP), and His3 fusion protein", *Biotechnol. Prog.*, 2006, **22**, pp. 954–960.

[52] Nakamura Y., Ishii J., Kondo A., "Bright Fluorescence Monitoring System Utilizing *Zoanthus sp.* Green Fluorescent Protein (*ZsGreen*) for Human G-Protein-Coupled Receptor Signaling in Microbial Yeast Cells", *PLoS One*, 2003, **8**, e82237.

[53] Shimon I., Yan X., Taylor J. E., Weiss M. H., Culler M. D., Melmed M., "Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation", *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**, pp. 789–798.

[54] Casarini A. P., Jallad R. S., Pinto E. M., Soares I. C., Nonogaki S., Giannella-Neto D., Musolino N. R., Alves V. A., Bronstein M. D., "Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment", *Pituitary*, 2009, **12**, pp. 297–303.

[55] Duran-Prado M., Gahete M. D., Martinez-Fuentes A. J., Luque R. M., Quintero A., Webb S. M., Benito-Lopez P., Leal A., Schulz S., Gracia-Navarro F., Malagon M. M., Castano J. P., "Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, **94**, pp. 2634–2643.

[56] Vieira Neto L., Taboada G. F., Gadelha M. R., "Somatostatin receptors subtypes 2 and 5, dopamine receptor type 2 expression and gsp status as predictors of octreotide LAR responsiveness in acromegaly", *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 2008, **52**, pp. 1288–1295.

[57] Saito T., Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y., Takano J., Huang S. M., Suemoto T., Higuchi M., Saido T.

C., “Somatostatin regulates brain amyloid β peptide $A\beta_{42}$ through modulation of proteolytic degradation.” *Nat. Med.*, 2005, **11**, pp. 434–439.

[58] Shen L. P., Pictet R. L., Rutter W. J., “Human somatostatin I: sequence of the cDNA”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982, **79**, pp. 4575–4579.

[59] Shen L. P., Rutter W. J., “Sequence of the human somatostatin I gene”, *Science*, 1984, **224**, pp. 168–171.

[60] de Herder W. W., Hofland L. J., van der Lely A. J., Lamberts S. W., “Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours”, *Endocr. Relat. Cancer*, 2003, **10**, pp. 451–458.

[61] Lamberts S. W. J., van Der Lely A. J., de Herder W. W., Hofland L. J., “Octreotide”, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, pp. 246–254.

[62] Shimizu Y., Kanamori T., Ueda T., ”Protein synthesis by pure translation systems”, *Methods*, 2005, **36**, pp. 299–304.

[63] Singh A., Chen E. Y., Lugovoy J. M., Chang C. N., Hitzeman R. A., Seeburg P. H., “*Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the α-factor pheromone”, *Nucleic Acids Res.,* 1983, **11** , pp. 4049–4063.

[64] Shimizu Y., Inoue A., Tomari Y., Suzuki T., Yokogawa T., Nishikawa K., Ueda T., ”Cell-free translation reconstituted with purified components”, *Nat. Biotecnol.*, 2001, **19**, pp. 751–755.

[65] Ochman H., Gerber A.S., Hartl D.L., ”Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction”, *Genetics*, 1988, **120**, pp. 621–623.

[66] Pavlopoulos A., ”Identification of DNA sequences that flank a known region by inverse PCR”, *Methods Mol. Biol.*, 2011, **772**, pp. 267–275.

[67] Higuchi R., Krummel B., and Saiki R.K., ”A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions”, *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, pp. 7351–7367.

[68] Steffan N. Ho, Henry D. Hunt, Robert M. Horton, Jeffrey K. Pullen and Larry R. Pease, ”Site-

directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction", *Gene*, 1989, **77**, pp. 51–59.

[69] Bosley A.D., Ostermeier M., "Mathematical expressions useful in the construction, description and evaluation of protein libraries", *Biomol. Eng.*, 2005, **22**, pp. 57–61.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，多くの御指導，御鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の船津高志教授に心より御礼申し上げます．

研究内容における日々の実験や考察について多大なるご指導，ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の飯塚怜助教に心より感謝申し上げます．

マイクロ流体デバイスを設計，作成して頂くと共に，貴重なご指導，ご助言をいただきました，早稲田大学理工学術院基幹理工学部の庄子習一教授をはじめ，尹棟鉉博士，関根瑠威氏，井口彩香氏，川久保渉氏，早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の関口哲志教授に心より感謝いたします．

酵母細胞を恵与していただくと共に，貴重なご指導，ご助言をいただきました，神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の近藤明彦教授，石井純准教授，中村泰之博士に心より感謝いたします．

液滴ソーティングデバイスを用いたスクリーニングにご協力をいただきました，株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズの藤村祐博士，石毛真行博士，赤木仁博士に深く感謝いたします．

本研究に関してご指導，ご助言をいただきました東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の皆様に感謝いたします．

最後に，研究生活を支えてくださった両親をはじめ，多くのお世話になった方々に感謝いたします．

2018 年　1 月

櫻井　貴志