

博士論文（要約）

Development of multi-dimensional digital bioassay

and its application to enzyme screening

（多次元デジタルバイオアッセイの開発と

酵素スクリーニングへの展開）

本田 信吾

## 第1章 序論

デジタルバイオアッセイは、核酸やタンパク質などの生体分子にとどまらず、細胞・ウイルスなどの生体粒子の機能をも一分子・一粒子の解像度で評価可能な計測技術である。均一体積の微小リアクターを多数用意し、計測対象を確率的に封入することで一分子・一粒子を単離し、ハイスループットに各種解析ができる<sup>1</sup>。一方で既存のデジタルバイオアッセイでは、計測対象に対し、単一パラメータについて、単一条件でしか計測できない。この制限により、例えば酵素反応におけるミカエリス・メンテン定数や阻害剤への応答性といった基礎的な情報すら、一分子・一粒子計測においては得ることができない。これは計測対象をリアクター内に保持できないこと、封入に用いるオイルが洗浄できず、溶液交換を妨げることによる。チャンバーリアクターを用いた先行研究では、洗浄可能なミネラルオイルでチャンバーを封入することで溶液交換を実現した<sup>2</sup>が、チャンバー上にオイルが残るため溶液交換が数回に限られ、さらに疎水性分子がミネラルオイルに漏れ出すという問題があった。そこで本研究では、チャンバー内に計測対象を固定化し、オイルの代わりに洗浄不要なエアで封入することで、溶液交換可能かつ漏れ出しのない「多次元」デジタルバイオアッセイを開発し、定量的な多条件・多パラメータ計測の実現とその応用に取り組んだ。

## 第2章 溶液交換可能かつ定量的なデジタルバイオアッセイのためのシステム構築

本系では、直径  $3.3\ \mu\text{m}$ 、高さ  $0.4\ \mu\text{m}$ 、体積  $3.4\ \text{fL}$  のチャンバーが 570,000 以上配置された fL reactor array device (FRAD) をフォトリソグラフィとドライエッチングにより作製し、Fig. 1a のようにフローセルを組み立てた。エアによるサンプル封入と溶液交換は、Fig. 1b に示す通り実施した。まずエアによる FRAD への溶液封入と溶液交換に基づくデジタルバイオアッセイが定量的に実施できる前提条件として、1) チャンバー内の溶液が計測中安定で、蒸発しないこと、2) 各チャンバー内の溶液が独立で、クロスコンタミネーションしないこと、3) チャンバー内の溶液が残らず完全に交換されるか検証した。その結果、エアで封入後少なくとも 2 h はチャンバー内の溶液が安定かつ独立であること、少なくとも 30 回の溶液交換に耐えることが分かった。Fig. 1c には、バッファ (Blank) と蛍光色素 4-MU

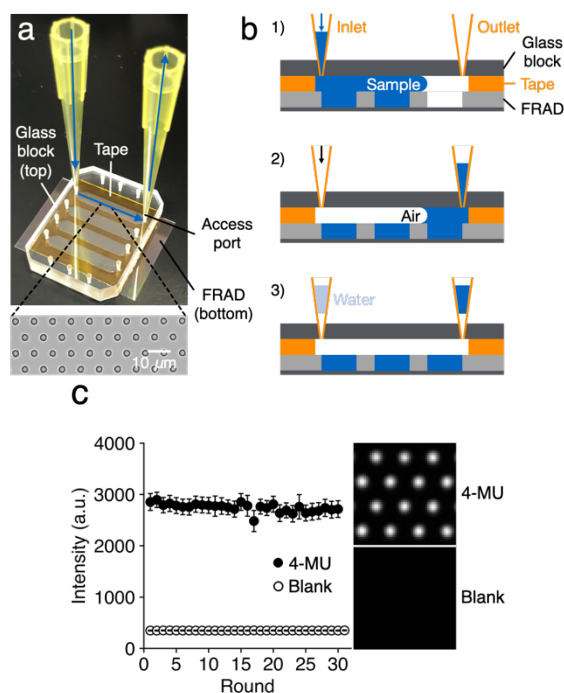


Fig. 1 エアによるチャンバーへの溶液封入と溶液交換。a) フローセル。b) エアによる封入手順。c) 30 回の溶液交換におけるチャンバーの平均蛍光強度。4-MU: 4-MU 封入時。Blank: バッファ一封入時。

を交互に 30 回封入した際の、各回のチャンバー内の平均蛍光強度を示した。バッファー封入時の蛍光強度が 30 回で変化せず（測定エラー 2 % に対し、0.05 % の上昇）、溶液交換で 4-MU が完全に洗浄されていることが分かる。

### 第 3 章 多次元デジタルバイオアッセイによるインフルエンザウイルスの一粒計測

次に本系によるデジタルバイオアッセイの定量性を検証するため、A 型インフルエンザウイルス (IAV) 表面のノイラミニダーゼ (NA) 活性をウイルス粒子単位で評価した。NA は IAV の出芽に重要な酵素である。IAV を FRAD にロードし、一粒子ずつチャンバー内に吸着させ固定化した (Fig. 2a)。続いて蛍光基質 MUNANA をロードし、エアで封入した。NA が MUNANA を蛍光色素 4-MU に変換することを利用し、チャンバーごとの蛍光強度の経時変化から各ウイルス粒子の NA 活性を算出した (Fig. 2b, c)。このとき、繰り返しの測定エラーを算出するため、同じ IAV 集団に対し溶液交換により 3 回同じ測定を繰り返した。その結果、25 ° C における NA 活性は平均 670 /s/particle (1304 粒子) と算出され、既往の報告<sup>3-6</sup>を基に算出した値 (500 ~ 2000

/s/particle) と比較し妥当であった。繰り返しの測定エラーはチャンバー間で異なり、2 %RSD 程度を中心に分布した (Fig. 2d)。照明ムラに由来するチャンバー間の測定エラーは 5.0 %RSD 未満であり、既存のデジタルバイオアッセイ<sup>7</sup>と同等であった。最後に、測定エラーを差し引いた、ウイルス内在的な NA 活性のばらつきは 33 ~ 39 %RSD と見積もられた。ウイルス粒子当たりの NA 分子数が粒子径に比例すると考えられることと、今回用いた IAV の粒子径のばらつき (34 %RSD) を併せると、妥当な結果と言える。以上により、本系を用いたデジタルバイオアッセイの定量性を示すことができた。

続いて本系による多条件下でのデジタルバイオアッセイの定量性を検証した。具体的には IAV の各ウイルス粒子について、NA 阻害剤 (NAI) に対する応答性の指標である IC<sub>50</sub> (活性を 50 % に低下させる阻害剤濃度) を評価した。インフルエンザ治療薬として広く用いられる NAI には耐性株が存在するが、ウイルス粒子ごとに IC<sub>50</sub> を評価する手法がないため、こうした耐性株の出現機構をウイルス粒子レベルで理解することは難しいのが現状

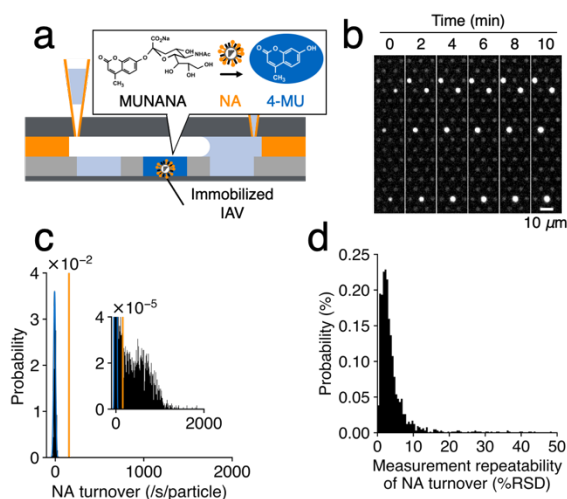


Fig. 2 IAV 一粒子の NA 活性解析。a) チャンバーへの IAV の固定化と NA 活性計測。b) 各チャンバーにおける 4-MU 蛍光強度変化。c) 各チャンバーにおける NA 活性。Orange: ウイルス粒子判定の閾値。閾値以上の活性を示したものをウイルス粒子と判定。d) 各ウイルス粒子の NA 活性計測の繰り返しの測定エラー分布。

である。そこで IAV を一粒子ずつチャンバーに固定化し、溶液交換により徐々に NAI である Oseltamivir の濃度を上げながら繰り返し NA 活性を計測することで、粒子ごとの  $IC_{50}$  の算出が可能か検証した。その結果、Oseltamivir 濃度依存的な NA 活性低下を観測し、 $IC_{50}$  の算出に成功した (Fig. 3a, b left)。 $IC_{50}$  の全粒子平均は 3.9 nM で、通常の生化学アッセイの結果 (3.4 nM) とよく一致した (Fig. 3b inset)。各粒子における  $IC_{50}$  算出の際のフィッティングおよび繰り返しの測定エラーはチャンバー間で異なり、94 % のリアクターで 10 % RSD 未満であった (Fig. 3c)。興味深いことに、測定エラーを差し引いても  $IC_{50}$  が粒子間で 17 ~ 22 % RSD のばらつきを有することが分かった。IAV はゲノム RNA 複製の際のエラー率が高く、同一の株内でも遺伝子多型が存在することが知られる。NAI に対する応答性が異なる遺伝子多型が  $IC_{50}$  のばらつきをもたらしている可能性が考えられるが、今後検証が必要である。以上により、本系により多条件下でのデジタルバイオアッセイの定量性を示すことができた。

多条件計測に加え、本系による多パラメータ計測が可能になれば、パラメータ間の相関解析などが可能となり、計測対象に対する理解の解像度を高められる。そこで本系での多パラメータ計測の可能性を検証するため、ある IAV 集団について、Oseltamivir に加えて同じく NAI である Zanamivir に対する応答性を同時に評価した。その結果、二つの NAI に対する  $IC_{50}$  を各ウイルス粒子についてプロットすることに成功した (Fig. 3d)。二つの  $IC_{50}$  の間に相関は認められず、ウイルス粒子間での二つの NAI に対する応答性は独立であることが分かった。二つの NAI の構造の違いが異なる応答を引き起こすことが報告されており、この結果は妥当であると考えられる。

#### 第 4 章 多次元デジタルバイオアッセイによる酵素アルカリフォスファターゼの一分子計測

本系が一分子計測にも適用可能であることを示すため、酵素アルカリフォスファターゼ (ALP) の一分子多パラメータ計測を試みた。従来のデジタルバイオアッセイによる酵素活性計測で、活性分布の異なる分子集団を一分子レベルで判別することは可能になったが、活性分布が重なる分子集団の判別は未だ困難である。そこで、本系を用いた多パラメータ

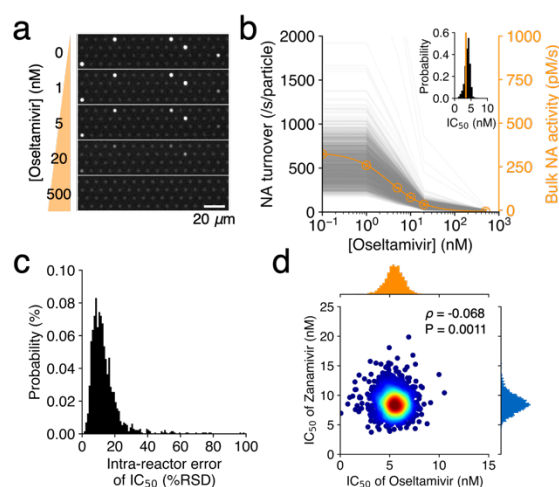
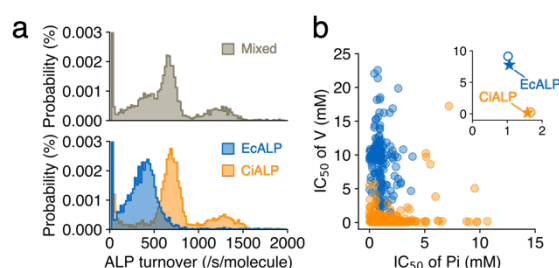


Fig. 3 IAV 一粒子の NAI 応答性解析。a), b) Oseltamivir 濃度依存的な NA 活性低下。Gray の各プロットがウイルス一粒子に対応。(inset) 各ウイルス粒子の  $IC_{50}$ 。Orange: 通常の生化学アッセイで算出した  $IC_{50}$ 。c) 各ウイルス粒子における  $IC_{50}$  算出の際のフィッティングおよび繰り返しの測定エラーの分布。d) 二つの NAI に対する応答性解析。ρ: Spearman の相関係数。

計測でこうした集団を判別できるか検証した。ALP は多くの生物種に広く発現が見られる酵素で、がんなどの疾患マーカーとして臨床検査の重要な指標でもある。各種阻害剤に対する ALP の応答性が酵素の由来ごとに異なることに着目し、活性分布が重なる大腸菌およびウシ小腸由来の ALP (EcALP および CiALP) の混合物 (**Fig. 4a**) について、ALP 阻害剤であるリン酸 (Pi) およびバナジン酸 (V) に対する  $IC_{50}$  を同時に計測し、プロットした (**Fig. 4b left**)。クラスター分析の結果、混合物を二つに分画することができ、それぞれの画分の重心における Pi、V に対する  $IC_{50}$

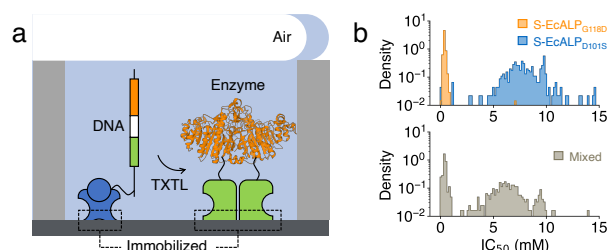
は、通常の生化学アッセイで算出した EcALP および CiALP それぞれの Pi、V に対する  $IC_{50}$  によく一致した (**Fig. 4b inset**)。このことは、二つの画分が EcALP、CiALP によく対応することを示している。これにより、これまで困難であった活性分布が重なる分子集団の判別に成功し、本系が一分子計測にも応用可能であることが示された。



**Fig. 4** ALP 一分子の阻害剤応答性解析。a) EcALP および CiALP の活性分布。b) Pi および V に対する各 ALP 分子の  $IC_{50}$ 。クラスター分析の結果の二つのクラスターを **Blue circle** と **Orange circle** で示した。(inset) Circles: 二つのクラスターの重心。通常の生化学アッセイによる EcALP (**Blue star**)と CiALP (**Orange star**)の  $IC_{50}$  を示した。

## 第 5 章 多次元デジタルバイオアッセイの酵素スクリーニングへの展開

最後に本系のさらなる展開として、新たな酵素スクリーニング法の開発に取り組んだ。高い活性や耐熱・耐溶媒性など、優れた形質を有する酵素の変異体を遺伝子ライブラリーの中から選択する酵素スクリーニングは、指向性進化法に代表される酵素改変プロセスにおける重要な工程である。従来のマイクロタイタープレート上でのスクリーニングに加え、近年、マイクロ流体工学を応用した超高速スループットの手法が報告されている。この手法では、多数の微小液滴 (fL ~ nL) の一つひとつに 1 コピーの変異体遺伝子と、発現システムおよびレポーター (e.g., 蛍光基質) を封入する。発現された変異体酵素の活性でレポーターが発するシグナルを指標として選択を行う。酵素スクリーニングを高効率化した本手法だが、遺伝子と酵素を保持したままの液滴内の溶液交換ができないため、発現環境下での活性に基づく選択しかできない。この制約は、発現環境で阻害を受ける酵素で特に問題となる。また、多条件計測 (e.g., 基質/阻害剤濃度依存性の計測) に基づく選択も困難である。



**Fig. 5** 溶液交換可能な酵素スクリーニング系。a) システム設計。b) 二つの ALP 変異体を別の FRAD に固定化し計測した  $IC_{50}$  (上段)と Mix して固定化し計測した  $IC_{50}$  (下段)。

そこで本章では、多次元デジタルバイオアッセイを応用し、溶液交換により任意の条件で選択が可能な酵素スクリーニング系を開発する。具体的には、遺伝子と酵素をタグによりチャンバーに固定化できるか検討した (Fig 5a)。そして Proof of Concept として、阻害剤応答性の異なる二つの ALP 変異体 DNA を混合したモデルライブラリーをチャンバーに固定化し、多条件計測により二つの変異体を区別できることを示した (Fig 5b)。

## 第 6 章 結論

本研究では、チャンバーリアクター内に計測対象を固定化し、エアで封入することで、溶液交換可能かつリークしない「多次元」デジタルバイオアッセイを開発した。そしてその定量性と、インフルエンザウイルス一粒子・酵素 ALP 一分子における多条件・多パラメータ計測を実証した。そして最後に本系が酵素スクリーニングに展開できる可能性を示した。このように多次元デジタルバイオアッセイは、既存のデジタルバイオアッセイの限界を拡張する革新的な技術であると言える。

## 参考文献

1. Basu, A. S. Digital Assays Part II: Digital Protein and Cell Assays. *SLAS Technol.* **22**, 387–405 (2017).
2. Ueno, H., Kato, M., Minagawa, Y., Hirose, Y. & Noji, H. Elucidation and control of low and high active populations of alkaline phosphatase molecules for quantitative digital bioassay. *Protein Sci.* **30**, 1628–1639 (2021).
3. Harris, A. *et al.* Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 19123–19127 (2006).
4. McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E. & McKimm-Breschkin, J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front. Microbiol.* **10**, 26–32 (2019).
5. Air, G. M. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respi. Viruses* **6**, 245–256 (2012).
6. Deshairs, C., Kessler, N., Aymard, M. & Quash, G. A. Catalytic Properties of the A/H3N2 Influenza Neuraminidases: Influence of Antigenic Variations. *J. Gen. Virol.* **67**, 409–418 (1986).
7. Basu, A. S. Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. *SLAS Technol. Transl. Life Sci. Innov.* **22**, 369–386 (2017).