審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　　名　　佐 藤　秀 介

医用機器、バイオセンサー、バイオ燃料製造システムなどの高機能化には、タンパク質機能の飛躍的な向上が本質的な課題である。遺伝子の変異と機能の淘汰の繰り返しであるダーウィン進化を、分子レベルで人為的に再現する進化分子工学は、高機能タンパク質を取得するための有力な手法の１つである。本論文は、微細加工技術に基づく高集積アレイチップをプラットフォームとする新たな高速分子進化システムを提案し、高集積 DNA アレイ、高集積タンパク質アレイ、高効率淘汰等の要素基幹技術を系統的に開発し、統合システムの構築を行った。本論文は以下の 5 章から構成される。

第 1 章では、高機能タンパク質の取得に関する従来のアプローチを概括するとともに、その限界を明らかにし、課題の解決戦略を提示した。進化分子工学においては、膨大な多様性を有する変異体ライブラリーの合成・淘汰の高効率化技術の構築が重要である。無細胞合成は、大規模ライブラリーの作製に非常に有利である上に、生細胞の世代周期や生理的環境に束縛されない新規分子機能の取得を可能にしてきた。しかし、無細胞合成を利用した分子進化においては、アフィニティー以外の触媒や発蛍光機能を高効率にスクリーニングする手法が欠落していた。この課題を克服する有力な戦略として、微細加工技術による高集積アレイをプラットフォームとする分子進化システムを開発することの意義を述べている。

第 2 章では、タンパク質アレイに変換可能な高集積 DNA アレイチップの作製方法を開発し、その有用性の実証を行った。具体的には、1 分子エマルション PCR 法を用いて、個々の磁気ビーズ上に 1 分子種の DNA を増幅・固定した。さらに、外部磁場を援用する自己整合を利用したランダム配置法により、マイクロウェルチップ上へ高い充填率（99.9 %）で DNA を固定した磁気ビーズをアレイ状に配置した。以上により、従来のスポッターを用いる逐次工程では実質的に不可能であった 25 メガの高集積 DNA マイクロアレイチップの作製が可能であることを実証した。

第 3 章では、第 2 章において開発した高集積 DNA ビーズマイクロアレイ技術を基盤とし、DNA ビーズマイクロアレイ上での一括無細胞合成により、高集積タンパク質マイクロアレイチップを得る手法を開発した。DNA 固定ビーズを配置したマイクロウェルアレイチップ上で、コムギ胚芽由来無細胞転写翻訳系を利用して GFP の合成を試み、488nm 励起による蛍光強度の上昇により、GFP のその場合成、フォールディングを確認した。さらに、GFP 発光団領域の 65 番目アミノ酸であるトレオニンのコドンに対して、Expression PCR により変異を導入した変異 DNA ライブラリーを高集積変異 DNA

ビーズマイクロアレイチップとして作製し、変異体タンパク質ライブラリーのオンチップ無細胞合成を実証した。本結果により、従来、困難とされたメガ規模の変異体タンパク質ライブラリーのマイクロアレイ化が可能であることが実証された。

第 4 章では、高速顕微蛍光アレイスキャナーと画像解析システム、マイクロマニュピレーターで構成されるハイスループットスクリーニングシステムを構築し、機能性に優れるタンパク質の遺伝情報の選択的取得と増幅を行い、マイクロアレイチップをプラットフォームとする変異体ライブラリーのオンチップ人工淘汰の実現可能性を実証した。メガ級の大規模変異体ライブラリーの分子機能情報を短時間で取得可能にするハイスループットスクリーニングシステムの開発により、遺伝情報の選択的回収と所望の機能性タンパク質の増幅を行う、マイクロアレイチップをプラットフォームとする人工淘汰が実施可能なことを示した。

第 5 章は以上の総括であり、さらに、マイクロアレイプラットフォームに基づく高速分子進化システムの今後の展望について述べている。

以上要するに、本論文は、アフィニティー以外の分子機能を進化させるため、マイクロアレイをプラットフォームとする分子進化システムを提案し、高集積 DNA ビーズマイクロアレイチップとオンチップ無細胞合成の連携により、25 メガ級の高集積タンパク質マイクロアレイチップの作製が可能であることを示すとともに、高速分子進化の実現の可能性を小規模変異体 GFP ライブラリーを用いて実証し、新規な分子進化システムを構築したものである。本論文で創出された新しい方法論は、進化分子工学手法の汎用性を拡張する技術であり、今後、有用酵素の取得などに繋がることが期待される。これらの成果は、バイオエンジニアリングの観点から有用性が高く、学術的にも価値が高いと判断される。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。