

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術
の創成」
研究課題「ナノバイオチップ技術を利用する高速酵
素分子進化システム創製」

研究終了報告書

研究期間 平成20年10月～平成26年3月

研究代表者：一木隆範
(東京大学大学院工学系研究科、准教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

進化分子工学の「考え方」と「技術」にナノバイオテクノロジーの「考え方」と「技術」を融合することにより、酵素反応などの複雑な生化学反応における生体分子機能(弱い分子間相互作用)を効率良く大量にスクリーニングし、進化させることが可能な世界初のシステムの実現を目指し、高集積マイクロアレイ技術の中核とする新たな高速分子進化システムの開発を進めた。

東大の一木グループは、25メガ DNA ビーズマイクロアレイ技術、オンチップ無細胞合成系を用いた一括タンパク質合成、マイクロインタリオプリント法の開発によるマイクロアレイプラットフォーム上のセントラルドグマの再構築、cDNA ディスプレイマイクロアレイ作製技術や cDNA ディスプレイへの光開裂機能の組込等の研究開発を鋭意行った結果、**10⁷~⁸規模の変異体ライブラリーを1枚のチップ上に集積化**することが可能になった。特に cDNA ディスプレイマイクロアレイの実現に不可欠な cDNA ディスプレイ用リンカーの開発は埼玉大の根本グループが中心になって行い、安定かつ効率のよいリンカーとその機能改変体を複数開発した。

さらに、東大の一木グループは、マイクロアレイをプラットフォームとする分子進化を実施するために必要な**高効率スクリーニングシステム**、具体的には高効率蛍光アッセイ用イメージャー、高活性分子選択のための自動画像解析ソフトウェア、マイクロピペットによるビーズ回収機構、あるいは紫外線の局所照射による光開裂型 DNA 回収機構を統合した装置システムの開発を行った。

これらの基盤要素技術を統合して運用し、緑色タンパク質GFPの変異体ライブラリーをモデルに用いて、蛍光イメージングにより評価、ランク付けした優性分子種(発蛍光性GFP)の遺伝子情報をビーズの選択的ピックアップにより回収し、これをPCR増幅して第2世代DNAライブラリーを構築した。すなわち、**マイクロアレイフォーマット上の変異体ライブラリーを利用して分子進化サイクルを進められることの原理実証**に成功した。

続いて、スクリーニングする変異体ライブラリーの大規模化に向けた諸要素技術の高度化を進めるとともに2糖分解酵素βグルコシダーゼ(BGL)の分子進化に向けて変異体 cDNA ライブラリーの作製、酵素の蛍光アッセイに用いる人工基質の開発などの準備を進めた。前者では、チップ上での無細胞合成の際に用いる高額試薬の使用量の低減とマイクロウェルへ内への試薬導入における再現性の課題を克服するため、**マイクロ流体デバイスを利用する試薬の自動導入法**を開発した。一方、後者の変異体 BGL ライブラリーの作製においては、当初、野生の cDNA 配列のままでは我々が用いる無細胞合成系を用いて BGL を有効に合成できなかったため、東大の船津グループがコドンユース(種によってコドンの使用頻度が異なる問題)を検討し、本研究で使用可能な BGL の cDNA が得られた。また、活性部位付近のアミノ酸をコードする配列に変異を導入して**変異体 BGL ライブラリーを作製**した。また、発蛍光基質の開発、合成は埼玉大が担当した。

さらに、実際の有用分子の取得においては、マイクロアレイのプラットフォーム上で進化サイクルを回して(1次スクリーニング)得られた候補有用分子について、その単位量当たりの活性を定量評価して確認する2次スクリーニングの実施が必要である。通常、この作業は大腸菌等を用いて相当量の酵素を合成し、活性評価を行うため1週間程度が必要となる。東大の船津グループはナノホールアレイを用いた1分子酵素アッセイ法を研究し、**1時間程度の測定で1分子酵素の活性を正確に評価できる2次スクリーニング技術**を確立した。

以上のように、本プロジェクトは、マイクロアレイチップをプラットフォームとする新規の分子進化システムを提唱し、その実現に必要な基盤要素技術の総合的开发を達成し、世界初のチップ上での酵素分子進化にいいよ手の届く段階まで来ている。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. マイクロインタリオプリンティング法の開発

論文: Appl. Phys. Express, 4, 047001 (2011), Appl. Phys. Express, 6, 087001 (2013)

概要:凹版印刷の微細化により、核酸やタンパク質等の生体分子を任意の形状で基板上に固

定する技術を開発した。本法と大規模 DNA ビーズアレイ技術を組み合わせることで、マイクロアレイのプラットフォーム上で生命のセントラルドグマ(DNA \leftrightarrow RNA \Rightarrow タンパク質に至る物質合成、情報伝達の流れ)を再構築することが可能となった。本技術は、変異体プロテインライブラリーアレイや mRNA ディスプレイマイクロアレイを簡便かつ効率よく作製することを可能にするものであり、機能プロテオミクス研究の強力なツールとなりうる。

2. マイクロアレイ化ライブラリーを用いる革新的分子進化手法の提唱と原理実証

概要:従来、多くの研究者が機能タンパク質や酵素の機構解明のために、細胞を用いて手作業でミューテーションをかけている。また、効率のよい分子進化手法として知られるファージディスプレイは、アダマーなどの強い分子親和性の機能向上にしか適用できない。マイクロアレイを用いる分子進化手法はこれらの課題を克服するものであり、また、従来、不可能であった変異体ライブラリーの機能適応度の分布状態とその変遷を俯瞰しながら進化サイクルを進めることを可能にする斬新な方法論である。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 大規模 DNA ビーズアレイ作製装置の開発

概要:磁気ビーズ自動配置装置を開発し、大規模マイクロウェルアレイ上に 99% の高い充填効率で DNA 固定化ビーズを迅速に配置することが可能になった。この手法を、エマルション PCR 法を用いて1つの磁気ビーズ上で 1 種類の配列をもつ DNA を増幅し、固定する技術と併用することにより、25メガ、114メガ規模の変異体 DNA ライブラリーのマイクロアレイ化が達成された。

2. 大規模集積マイクロアレイスクリーニングシステムの開発

概要:マイクロアレイのプラットフォーム上で、有用生体分子の高効率スクリーニングを可能にするためのスクリーニングシステムの試作機を開発した。本システムは、高速高解像度蛍光アッセイ用イメージャーと画像処理ソフトウェア、リンカー分子の光切断による DNA 回収機構から構成される。イメージャーは 60mm 角チップを約 5 分で全域スキャンし、分解能 $\sim 1\mu\text{m}$ で蛍光画像を取得可能で、これに比肩する装置は存在しない。本システムの開発により、我々が開発したマイクロアレイ化した変異体ライブラリーに対して、分子進化を行うことが可能になった。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

本研究が目指した目標は「セル型分子進化リアクター技術を用いる高速酵素分子進化」の達成であり、そのために必要な基盤技術を開発するべく、大きく以下の4つのサブテーマを掲げ、一木グループ(東大院工)、根本グループ(埼玉大・工)、船津グループ(東大院薬)がそれぞれの独自技術、専門分野を深く追求するとともに、相互の有機かつ強力な連携により、最終目標であるセル型分子進化リアクターの実現を目指した。

(サブテーマ1) セル型分子進化リアクタープラットフォームの開発

(サブテーマ2) cDNA ディスプレイ技術の拡張・高機能化

(サブテーマ3) タンパク質機能の1分子イメージングによる高感度スクリーニング法の開発

(サブテーマ4) マイクロアレイチップを用いた精密分子移送技術/分子増幅技術

なお、プロジェクト開始当初は、各グループがサブテーマを担当する形で要素技術の開発を開始したが、グループ間の枠を超えた密接な連携が不可欠と判断し、共同研究の進め方を修正した。特に(サブテーマ2)と(サブテーマ4)においては「変異体ライブラリーのマイクロアレイ化技術の開発」を重要な共通テーマに設定し、一体となって共同研究開発を進めた。大規模 DNA ビーズアレイ技術を達成した後は、マイクロインタリオプリント技術の開発へと加速的に発展し、多くの有用基盤技術の開発に繋がった。また、プロジェクト開始後に、企業との良好な協力関係を構築する機会を得て、スクリーニングシステムのハードウェア開発は当初の想定を(予算、技術の両面において)超える水準で進めることができた。

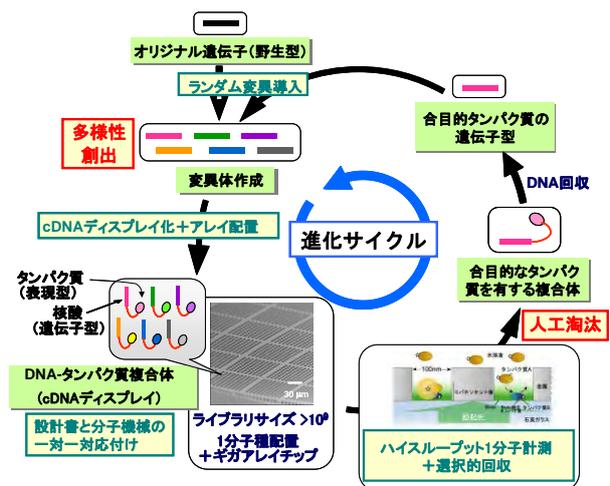


図1 セル型進化リアクターシステム概要

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

① 中間評価で受けた指摘や助言、それを踏まえて対応した結果について

当初の研究構想をほぼ達成し、順調に進捗しているとの評価をいただくとともに、中間評価ではシステムの動作検証の段階までであったが、求められているのは「より良いもの」を分子進化により「作り出す」、「見つけ出す」ことにあるので、どのような「尺度」「評価基準」で選別を行うかが重要となる。これをシステムに組み入れる、それにより予想外の機能タンパクが見つかる、といったパフォーマンスを上げる、というような方向も視野にいれるようにとのご意見をいただいた。それを踏まえて、スクリーニングシステムには、温度による淘汰圧制御の機能を組み込み、蛍光アッセイにより測定する酵素機能を自動で解析するソフトウェアの開発を進め、分子進化のためのスクリーニングシステムの構築を行った。また、中間評価時点での我々の分子進化技術のコンセプト実証においては、細かなスキルを必要とし、再現性に課題のある工程が含まれているという課題があった。これは、実際に分子進化実験を行う上では、時間、経費、労力のいずれの面でも大きな障壁になることから、中間評価以降は、それらの工程の再現性向上、さらなる効率化のための技術開発を進めた。さらに、本プロジェクトでは、分子進化の対象として酵素を想定していることから、酵素の専門家との共同研究も考えるようにとのご助言をいただいた。こ

れに対しては、東京大学大学院農学系研究科の鮫島正浩先生、五十嵐圭日子先生に共同研究をお引き受けいただき、セロビオース分解酵素 β -グルコシダーゼ (BGL) の cDNA のご提供を受けるとともにその構造や機能、活性評価技術等について詳細な情報をいただいた。現在までに、我々のプラットフォーム上で BGL の変異体ライブラリーの分子進化を実施する準備がほぼ整っている。

② 上記①以外で生まれた新たな展開について

酵素分子の活性を正確に定量する 2 次スクリーニングのためのナノホールアレイによる酵素活性評価技術の準備検討において、BGL の 1 分子解析を行う過程でグルコースによる反応阻害機構が明らかになった。

§ 3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「一木」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
一木 隆範	東京大学大学院工学系研究科	准教授	H20.10～H26.3
赤木 貴則	東京大学大学院工学系研究科	特任助教、 特任講師	H20.10～H26.3
Manish Biyani	東京大学大学院工学系研究科	特任助教	H21.1～H26.3
倉持 宏実	東京大学大学院工学系研究科	特任研究員	H24.4～H26.3
上野 真吾	東京大学大学院工学系研究科	特任研究員	H24.4～H26.3
齋藤 敬	東京大学大学院工学系研究科	特任研究員	H20.10～H22.3
毛利 秀平	東京大学大学院工学系研究科	M2,D1～D3	H20.10～H26.3
大澤 輝恒	東京大学大学院工学系研究科	M2	H20.10～H21.3
津田 晋	東京大学大学院工学系研究科	B4,M1～M2	H20.10～H24.3
小野 堯生	東京大学大学院工学系研究科	D1～D2	H21.4～H23.3
森安 純平	東京大学大学院工学系研究科	M1～M2	H21.4～H23.3
佐藤 秀介	東京大学大学院工学系研究科	M1,M2,D1～ D3	H21.4～H26.3
藤田 孝紘	東京大学大学院工学系研究科	M2	H22.4～H24.3
田中 陽子	東京大学大学院工学系研究科	M1～M2	H23.4～H25.3
小林 遼	東京大学大学院工学系研究科	M1～M2	H23.4～H25.3
Subhashini Raji Kumal	東京大学大学院工学系研究科	M1～M2、D1	H23.4～H26.3
平井 辰典	東京大学大学院工学系研究科	M1～M2	H25.4～H26.3
福田 拓海	東京大学大学院工学系研究科	M1	H25.4～H26.3

研究項目

- ・マイクロアレイを用いる分子進化プラットフォームの開発
- 1. 変異体ライブラリーのマイクロアレイチップ化技術
- 2. 蛍光アッセイ、選択的分子回収装置技術の開発
- 3. 小規模ライブラリーをモデルとする進化サイクル実施可能性の検証
- 4. 開発した分子進化プラットフォームの酵素分子への応用

②「根本」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
根本 直人	埼玉大学理工学研究科	准教授	H20.10～H26.3
眞塩 由佳	埼玉大学理工学研究科	技術員	H24.4～H26.1
松岡 浩司	埼玉大学理工学研究科	教授	H20.10～H26.3
望月 佑樹	埼玉大学理工学研究科	M1～2,D1～3	H20.10～H26.3
熊地 重文	埼玉大学理工学研究科	M1～2、D1	H23.4～H26.3
河野 文昭	埼玉大学理工学研究科	B4,M1～2	H22.4～H26.3

澤田 貴宏	埼玉大学理工学研究科	B4,M1~2	H23.4~H26.3
吉川 祐紀	埼玉大学理工学研究科	B4,M1~2	H23.4~H26.3
長谷川 敦	埼玉大学理工学研究科	M1	H25.4~H26.3
Naimuddin Mohammed	埼玉大学理工学研究科	雇用研究員	H21.4~H21.8
上野 真吾	埼玉大学理工学研究科	雇用研究員	H22.4~H24.3
木村 真之介	埼玉大学理工学研究科	B4,M1~2	H20.10~H23.3
小林 省太	埼玉大学理工学研究科	M1~2	H22.4~H24.3
谷垣 保幸	埼玉大学理工学研究科	M1~2	H22.4~H24.3
福島 貴之	埼玉大学理工学研究科	M1~2	H22.4~H24.3
四本 勇也	埼玉大学理工学研究科	M1~2	H23.4~H25.3
鈴木 美穂	埼玉大学理工学研究科	助教	H22.4~H26.3

研究項目

- ・cDNA ディスプレイ技術の拡張・高機能化

③「船津」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
船津 高志	東京大学大学院薬学系研究科	教授	H20.10~H26.3
角田 誠	東京大学大学院薬学系研究科	講師	H20.10~H26.3
岡部 弘基	東京大学大学院薬学系研究科	助教	H20.10~H24.9
飯塚 怜	東京大学大学院薬学系研究科	助教	H21.3~H26.3
杉野 弘和	東京大学大学院薬学系研究科	D3	H20.10~H21.3
鮫島 知哉	東京大学大学院薬学系研究科	D2~3	H20.10~H22.3
増田 智彰	東京大学大学院薬学系研究科	M2	H21.4~H22.3
有森 千穂子	東京大学大学院薬学系研究科	M2	H21.4~H22.3
近藤 将司	東京大学大学院薬学系研究科	M2	H21.4~H22.9
橘 昌利	東京大学大学院薬学系研究科	M2	H22.4~H23.3
田原 健太郎	東京大学大学院薬学系研究科	M1~2	H23.4~H25.3
岡田 はるか	東京大学大学院薬学系研究科	M1	H25.4~H26.3

研究項目

1. タンパク質機能の1分子イメージングによる高感度スクリーニング法の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

進化工学技術を基盤とする研究開発事業である埼玉バイオプロジェクト（都市エリア圏央・地域イノベーションクラスタープログラム）と連携し、cDNA ディスプレイ技術を基盤にその発展に寄与した。

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 酵素分子進化リアクターのためのプラットフォームの開発(東京大学 一木グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1. オンチップ高速分子進化システムとその基盤要素技術

高集積マイクロアレイチップ技術に基づく高速分子進化システムとその運用スキームの一例を図1に示す。まず、①エラープローン PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法などを用いて、進化させたいタンパク質あるいはペプチドをコードする DNA に人為的に変異を導入したライブラリーを作製し、②これらを並べて高集積マイクロアレイ化する。次に、③DNA アレイチップに無細胞合成系を作用させ、プロテインアレイチップに一括変換する。続いて、④ハイスループット顕微蛍光イメージング技術を用いてタンパク質の機能(例えば酵素活性など)を蛍光アッセイにより超並列で評価し、着目した機能についてランク付けを行い、⑤優れた機能を示したタンパク質の遺伝子情報を選択的に回収する(人工淘汰)。ここで、一種のマイクロリアクター技術が応用され、変異体タンパク質は個別に封入された状態で合成、あるいは機能評価される。このため、我々が開発しているシステムはセルアレイ型分子進化リアクターと呼ぶこともできる。⑥選択的に回収された DNA を増幅、また、必要に応じて変異導入して第 2 世代 DNA ライブラリーを構築する。このような「変異導入→淘汰→増幅」のサイクルを繰り返すことにより、タンパク質ライブラリーの所望の機能を定方向進化させる。

このようなマイクロアレイチップ上での分子進化を装置システムとして実装するためには数多くの挑戦的な課題を新たな技術で克服する必要がある。しかも、トータルなシステムを構築するために各要素技術間の整合性を得ることが不可欠であり、総合的な技術開発が進められてきた。以下に、具体的な技術の概要を説明する。

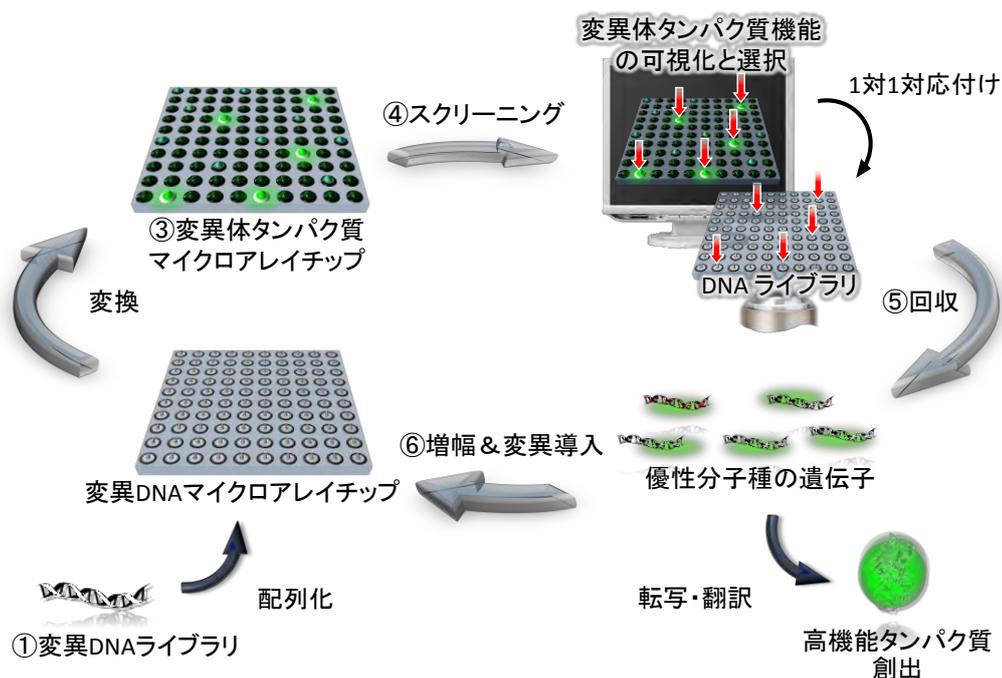


図 1 マイクロアレイ技術を用いた高速タンパク質分子進化システムの概略図。①変異 DNA ライブラリーの作製、②高集積変異 DNA マイクロアレイの作製、③変異体プロテインマイクロアレイの作製、④タンパク質の機能の評価、⑤合目的機能を有するタンパク質の選択と遺伝子情報の回収、⑥回収した DNA の増幅と変異導入、⑦ ②から⑥の繰り返しによる高機能タンパク質の創出

2. チップ上での変異体DNAライブラリー、変異タンパク質ライブラリーのマイクロアレイ化技術

DNA アレイチップやプロテインアレイチップの製造では、予め合成した構造既知の生体分子を逐次、スポッティング技術等によりチップ上の特定の位置にアレイ状に固定する方法がよく用いられる。このように「位置情報」と分子種を「1対1対応付け」する方法論は、チップ上に搭載する分子種が高々 10^4 個の通常のDNAアレイチップやプロテインアレイチップの製造には適用できるが、 10^8 を超える分子種数を扱う進化分子工学に利用するチップでは、もはや時間的にも経済的にも適用できない。そこで、本研究課題では、大規模数の変異体DNAライブラリーをランダムにアレイ状に配置するDNAアレイチップの製造技術と、このDNAアレイチップからプロテインアレイチップへと一括変換する技術、ならびにこの変換の過程で分子の構造情報(遺伝子型)と機能(発現型)の「1対1対応付け」を行い、変異タンパク質のスクリーニングに必要な機能評価と構造同定を高効率で行うことを可能にする。

2-1. 大規模DNAビーズマイクロアレイ技術の開発

進化分子工学に用途を特化して考案された高集積DNAマイクロアレイチップの作製方法を図2に示す。本法は大別して2つの工程から成る。まず、BEAMing (beads, emulsions, amplification and magnetics) と称される技術を転用して、変異DNAライブラリーの1分子ずつを個別に増幅し、直径数 μm の磁気ビーズの表面にDNAを固定化する。次に、DNAの担体となった磁気ビーズを操作し、自己整合の原理により短時間でアレイ状に一括配置して、大規模な変異DNAライブラリーを搭載したマイクロアレイチップを得る。

BEAMing法はデジタルPCR法の1つであり、元々は希少な変異遺伝子の検出とその存在率を高精度に計測するための技術として考案されたものである。水/油エマルジョンの限られた反応空間中で鑄型DNAを増幅させるエマルジョンPCR法において1つのエマルジョンあたり1分子程度が含まれるように希釈されたDNAを増幅し、且つ、PCRプライマーを表面に多数固定した磁気ビーズを用いることにより個々のビーズ担体表面上に数1000個の複製されたDNA分子を固定することができる。

他方、自己整合の原理により磁気ビーズをチップ上に一括配列させる技術は、筆者らが生体分子の迅速なマイクロアレイ化を可能にする技術として考案したものである。多数のマイクロウェルをアレイ状に形成したチップ上に磁気ビーズの分散液を展開し、チップ裏面から近づけた複数の小型磁石を機械的にx,y方向に走査する。すると、磁気ビーズは集団となってチップ表面上を流れるように移動しながら、マイクロウェルアレイの凹部に自動配列してゆく。マイクロウェルアレイの直径を磁気ビーズよりもわずかに大きく、且つ、2つ以上のビーズが入ることができないように設計することで磁気ビーズは1つのウェルに必ず1つしか配置されず、比較的短い数10分の時間で $10^7 \sim 10^8$ 個のビーズを99%以上の非常に高い充填率でアレイ状に配置できる。本法により、60mm \times 60mmの面積内に2.8 μm 径の磁気ビーズを用いて2,500万個(25メガ)の、1 μm 径の磁気ビーズを用いて1億1,400万個(114メガ)のDNA担体ビーズを集積したチップの作製が達成されている。

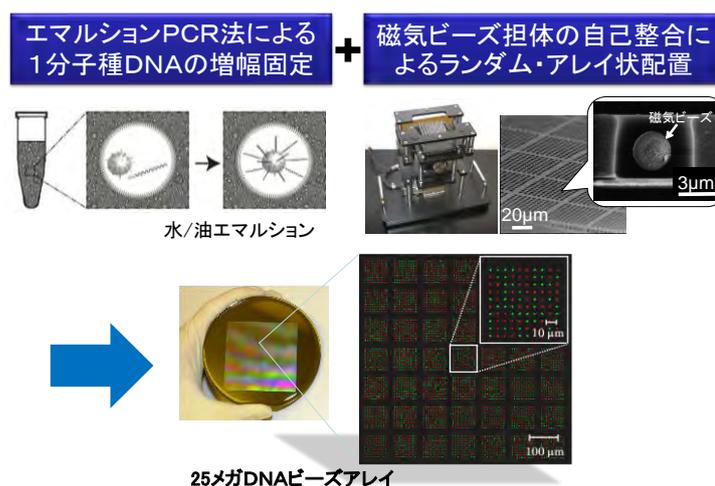


図2 1分子エマルジョンPCRにより1種類のDNAを増幅し、表面に固定化した個々の担体ビーズを自己組織化により配列したDNAアレイチップ。メガ・ギガスケールの変異DNAライブラリーのアレイ化に対応可能な技術である。右上図は自動ビーズ配列装置試作機。

2-2. チップ上での無細胞合成による変異体タンパク質ライブラリーアレイ作製技術

上記の技術開発により、変異 DNA ライブラリーを高密度に集積したマイクロアレイが達成されたが、我々の目標はタンパク質の機能向上である。そのためには変異体タンパク質ライブラリーをマイクロアレイ化することが必須である。そこで、DNA ビーズマイクロアレイ上に存在する遺伝子からコードされているタンパク質を超並列的に合成する技術が検討され、114 メガの DNA ビーズマイクロアレイを用いてプロテインマイクロアレイに一括変換できることが示された。

図 3 に示すようにマイクロアレイチップの素材であるポリジメチルシロキサン (PDMS) の疎水性と DNA 担体であるビーズ表面の親水性を巧みに利用したオイル封止法により、磁気ビーズの自己整合配置で用いた多数のマイクロウェル構造を、タンパク質合成のための個々に隔離された反応容器としても利用する。DNA 固定ビーズが配置されたマイクロアレイチップ上に無細胞翻訳液を展開し、直後にオイルを薄く展開することで個々のマイクロウェルを独立した反応空間として切り離す。マイクロウェル内では無細胞合成が進み、ビーズ上の DNA から mRNA が転写され、さらにタンパク質が翻訳される。その結果、チップ上では膨大な種類の変異体タンパク質がアレイ状に並んで合成される。図 3 右の写真は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする DNA (塩基長: 約 1,000 bp) の変異ライブラリーを配置したマイクロアレイチップ上で、無細胞合成 (30°C, 120 min) を行って得られた結果を示す。図中の蛍光顕微鏡写真は GFP をコードする DNA が搭載された DNA ビーズマイクロアレイ (固定された DNA は蛍光分子 Cy5 で標識されており、赤い蛍光を発している) から GFP の緑色蛍光がアレイ状に並んで観察されるマイクロアレイが得られたことを示している。このモデル実験では、発光団領域内のアミノ酸 1 箇所ランダム置換変異を導入した DNA ライブラリーが用いられており、緑色蛍光の輝度が「アレイ上の位置」により、異なっているのは GFP の発現量のばらつきによるのではなく、変異導入に起因して発光性が異なる変異体 GFP が合成されたことによる。

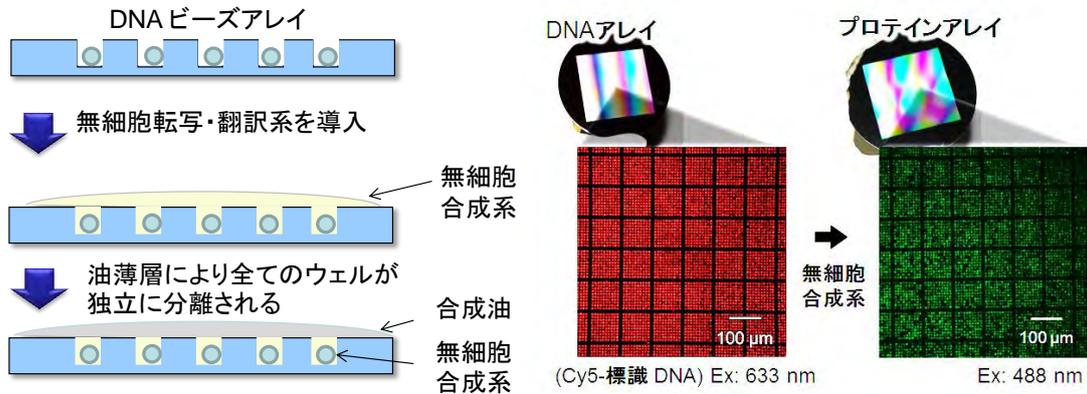


図 3 高集積 DNA マイクロビーズアレイチップ上での無細胞合成

2-3. マイクロインタリオプリント技術

上節では、変異 DNA が集積されたチップ上で無細胞合成系を働かせることにより、一括で変異体タンパク質ライブラリーを作製できることを述べたが、そこで合成されたタンパク質はマイクロウェル中に浮遊する形で存在しており、分子が基板に固定されている通常のプロテインマイクロアレイチップとは異っている。そのため、チップ単位で一括で行う洗浄や溶液交換などのマイクロアレイチップにおいて一般的かつ非常に有用な操作を実施できない。この課題を解決する技術として、生体分子のパターン状固定技術の1種である「マイクロインタリオプリント法(マイクロ凹版印刷)」が開発された。これは、**図 4** に示すように微細な凹版に生体分子を充填して基板に押し付けることで、微細なパターン形状に沿って生体分子を基板に固定する技術である。本法は、①無細胞合成系を用いた「その場」合成を行いながら、②生体分子をウェットな生理的条件下で、③リンカー修飾された基板に分子の配向性等まで制御して固定可能であるなど、他の生体分子パターン形成技術には無いいくつかの優位性を有する。特に DNA ビーズマイクロアレイから出発して、RNA、ペプチド、タンパク質などのパターンニングに適用できることが既に実験的に示され、**図 5** に示すように、セントラルドグマにおける生体分子の合成や情報の流れをマイクロアレイというプラットフォーム上に再現できるようになっている。マイクロインタリオプリント法と無細胞合成技術の組み合わせは、様々な生体分子の大規模な変異体ライブラリーを低いコストと短い時間でマイクロアレイ化することが可能な汎用性と有用性の高い技術である。例えば、mm から μm のスケールへと微細化した系で生化学合成を行うことにより、必要な合成試薬の量は単純計算で $1/10^9$ に激減する。さらに、印刷技術であるがゆえに必然的に生じる印刷版と印刷物の間の鏡像の位置関係が、セントラルドグマに存在しないタンパク質から DNA に向かう情報の「対応付け」を可能にしていることも特筆に値する。このことはプロテオミクスへの応用において重要な意味をもつ。

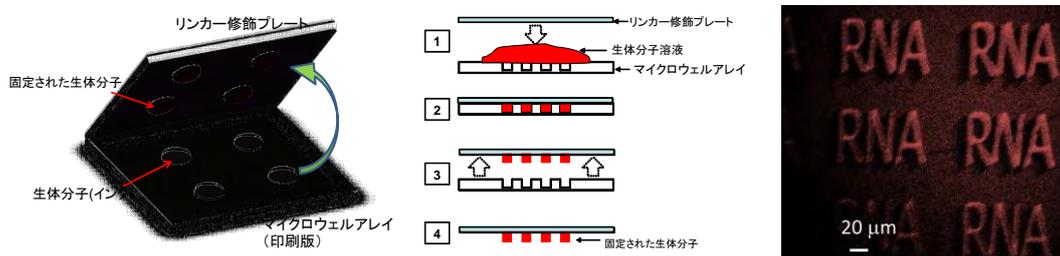


図 4 マイクロインタリオプリント技術. mRNA アレイチップ、プロテインアレイチップ等の作製を可能にする。生体分子を乾燥させることなく、生理的条件下に近い環境下で固定が可能、マイクロメートルの微小空間内で「その場」生化学合成が可能などの特徴を有する。右図は『RNA』の文字形状のモールドを用いて RNA 分子をプリントした例。

2-4. mRNAマイクロアレイ

マイクロインタリオプリント法において mRNA をインクに用いて微細アレイパターンの形成が検討された。ここで、金を被覆したガラス板にチオール結合を介して自己組織化オリゴヌクレオチドリンカーを修飾した基板が mRNA の捕捉・固定に用いられた。固定用リンカー分子に mRNA を効率よくハイブリダイズするためには、プリント中の mRNA の 2 次構造を最小化するためのアニール温度の最適化などが必要であるが、直径約 $1 \mu\text{m}$ の微細なアレイパターンも高コントラストで形成できることが示された。DNA ビーズアレイを印刷版として用い、無細胞転写系により mRNA をその場合成しながら印刷を行うと DNA ビーズアレイに対して相補的な塩基配列を有する mRNA マイクロアレイを鏡像の位置関係を保持してパターンニングすることが可能である (**図 5**)。

2-5. プロテインマイクロアレイ

マイクロインタリオプリント法と無細胞転写・翻訳系を利用したプロテインマイクロアレイ作製も検

討された。GFP にヒスチジンタグの配列を付加した DNA を搭載した DNA ビーズマイクロアレイが「印刷版」として用いられた。ニッケル-ニトロ三酢酸錯体(Ni-NTA)で表面修飾したガラス基板を用意し、無細胞転写・翻訳系の溶液を挟んで DNA ビーズマイクロアレイ表面に密着させた。マイクロウェル内ではビーズ上の DNA から転写と翻訳の反応が同時に進行し、合成された GFP はヒスチジンタグを介して基板上の Ni-NTA とキレート結合する。以上のような簡単な工程により、DNA マイクロアレイチップ上で合成されたタンパク質が一括で基板の上に固定できるようになった(図 5) (M. Biyani, et al., *Appl. Phys. Express* 6: 087001, 2013)(特願 2010-191060)。

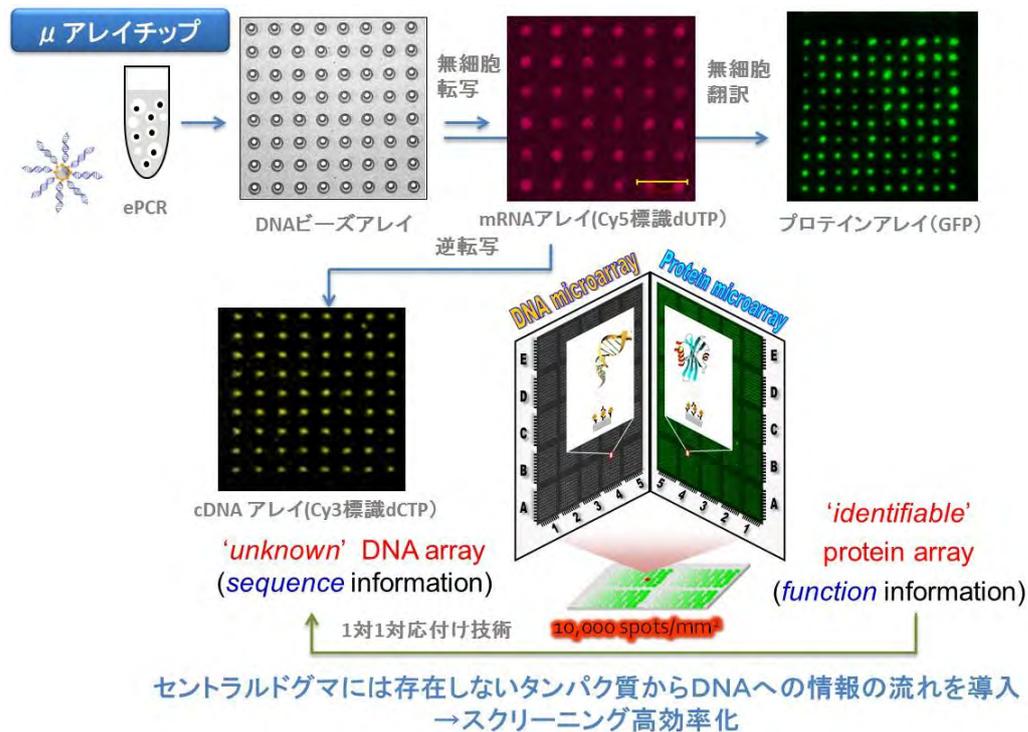


図 5 チップ上でのセントラルドグマの再現による物質合成、情報伝達の流れ

2-6. cDNAディスプレイアレイ

前節の mRNA マイクロアレイチップ上で逆転写酵素を働かせると、mRNA の捕捉に用いられたオリゴ DNA リンカーがプライマーとして働き、cDNA が合成される。また、同様に mRNA マイクロアレイチップ上で無細胞翻訳系を働かせるとチップ上でタンパク質が合成される。そこで、マイクロインタリオプリント法を利用して、*in vitro virus* (IVV; インビトロウイルス)、あるいは mRNA ディスプレイ、cDNA ディスプレイと呼ばれる核酸(遺伝子型)とタンパク質(発現型)を共有結合で連結させた分子複合体のマイクロアレイの一括形成を行うことも可能である。この場合には、合成されたタンパク質とこれをコードしている mRNA とを連結するために、① mRNA の配列から終始コドンを除いておき、5'→3'方向に mRNA 上を移動して翻訳を終了したリボソームを mRNA 上で解離させずに停滞させること、さらに② mRNA の捕捉に用いられるオリゴ DNA リンカーにタンパク質を捕捉する機能を付与するために、抗生物質ピューロマイシン(アミノアシル化 tRNA の 3'末端のアナログ分子)を末端に有する分枝鎖構造を予め追加しておくことが必要である。これらにより mRNA に留まったリボソームにピューロマイシンが取り込まれ、合成されたタンパク質の C 末端が分枝鎖と連結される。図 6 は、マイクロインタリオプリント法で形成した mRNA マイクロアレイに無細胞翻訳系を作用させて、mRNA ディスプレイマイクロアレイに変換した例を示す(M. Biyani, et al., *Appl. Phys. Express* 4: 047001, 2011)。この報告では mRNA を基板固定するリンカーはビオチンを介して基板に固定したストレプトアビジンに結合されているが、このストレプトアビジン-ビオチン結合を介するリンカー修飾では生体分子の固定密度の均一性や非特異吸着の抑制に課題があることも分かっている。この解決のため、金-チオール結合等により基板上に固定される自己組織化単分子膜(SAM)を利用した cDNA ディスプレイ形成用リンカーの開発も行った。

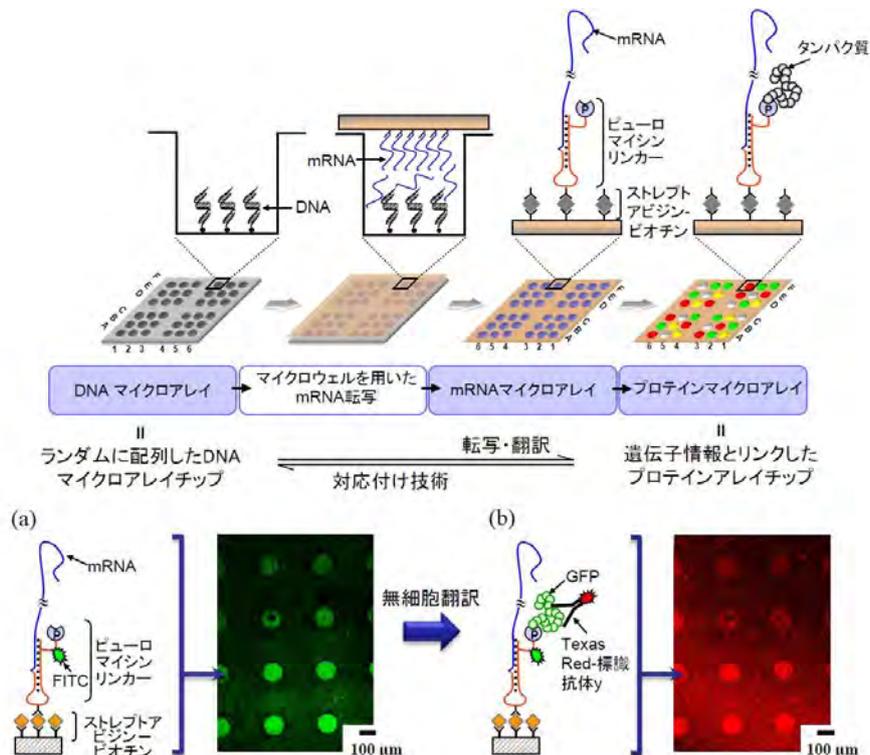


図 6 「DNA-タンパク質チップ」法によるラベル化タンパク質分子のアレイ化配置技術。(上) DNA マイクロアレイ(左)から mRNA マイクロアレイ(中央)、mRNA ディスプレイマイクロアレイ(タンパク質-mRNA 複合体マイクロアレイ)(右)への変換。(下) mRNA から翻訳されたタンパク質に蛍光標識した抗体を特異的に結合させ、GFP が固定されていることを確認。

2-7. cDNAディスプレイレイ用リンカー技術

マイクロアレイ上に強固にタンパク質を固定化し、そのタンパク質をコードする DNA を効率よく回収する為には、共有結合によってタンパク質及び DNA が連結される cDNA ディスプレイをマイクロアレイ上で行うことが適していると考えられる。

従来、リンカーの固相担体との結合はアビジン-ビオチン結合によって行っていたが、アビジンを介する結合は非特異吸着が多いという問題があった。そこで、金薄膜基板上へ、チオール分子を介して結合するリンカーを開発した。金薄膜基板は非特異吸着が少なく、チオール含有分子の自己組織化単分子膜を容易に形成することが出来る。また、mRNA との連結を可能とする為リンカーに分岐鎖構造を導入したほか、mRNA とリンカーの連結で用いられる T4 RNA Ligase やリボソームの活性が立体障害によって抑制されるのを防ぐ目的と、リンカーに標識した蛍光分子の蛍光が金薄膜によって消光されるのを防ぐ目的で、金薄膜とライゲーション連結部位の距離を自由に調節できるようなリンカー構造を設計した(特願 2011-242790)。さらに、マイクロアレイ上からタンパク質をコードする DNA を微小スポット特異的に効率よく回収する為、リンカーに光開裂分子であるニトロベンジル基を導入することで、任意の微小スポットへの短時間の紫外線照射によって容易に金基板上から DNA を回収することを可能にした(S. Ueno, et al., *J. Photopolymer Sci. Technol.* 25: 67-72, 2012)(特願 2011-242789)(図 7)。

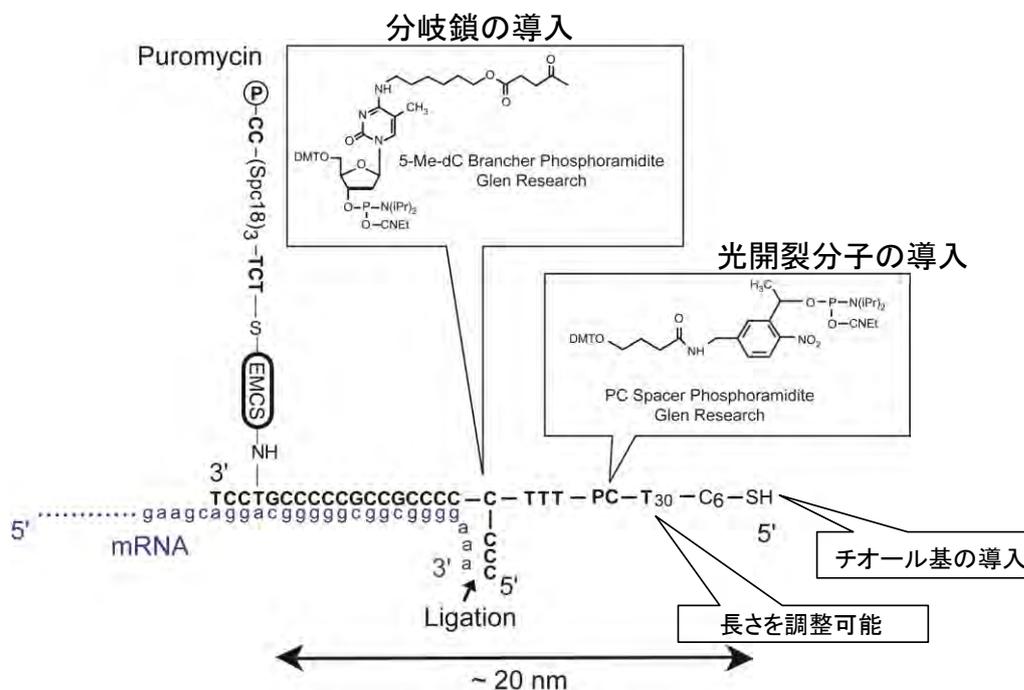


図 7 cDNA ディスプレイレイ用リンカー

リンカーと mRNA の連結には T4 RNA Ligase という酵素を用いていたが、基板に固定された基質に対する酵素反応は、液相での反応と比べ活性が落ちることが予測され、基板全面で反応を均一に行うには、反応時間の延長や高濃度の酵素の使用など、コストの向上と利便性の低下を招く可能性が懸念される。そこで、酵素による連結に代わり、光照射により mRNA と連結を行うリンカーを開発した。光照射によって基板上から DNA を回収することを考慮し、365 nm の光照射で架橋し、312 nm の光照射で解離する可逆性光架橋塩基である 3-cyanovinylcarbazole

nucleoside (CNVK)(図 8)をリンカーの構造内に導入した。設計においては、合成費用を安価に抑える目的で、分岐鎖等の複雑な構造を極力使わずに、基板結合部位、タンパク質連結部位、逆転写反応開始部位を含む、3鎖複合体構造を考案した。実際に3鎖複合体を合成し、基板上で形成させた結果、紫外線照射による領域選択的な架橋および解離を確認した(図 9)。また、紫外線照射によって、リンカーと mRNA を架橋した後、無細胞翻訳系によってタンパク質の提示を行った結果、基板上でのタンパク質提示の直接観察を初めて確認することができた(図 10) (特願 2013-509936)。

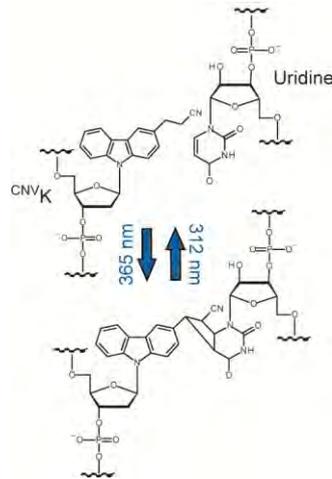


図 8 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (CNVK) の紫外線照射による結合・開裂反応

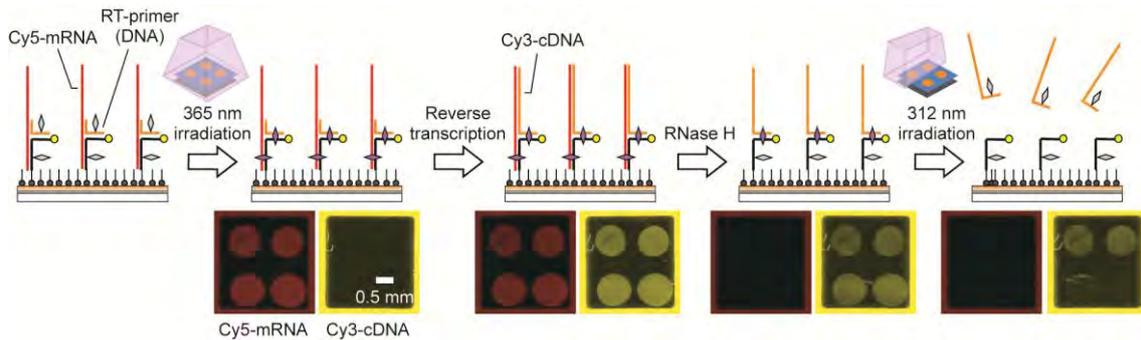


図 9 CNVK の光照射による架橋・切断

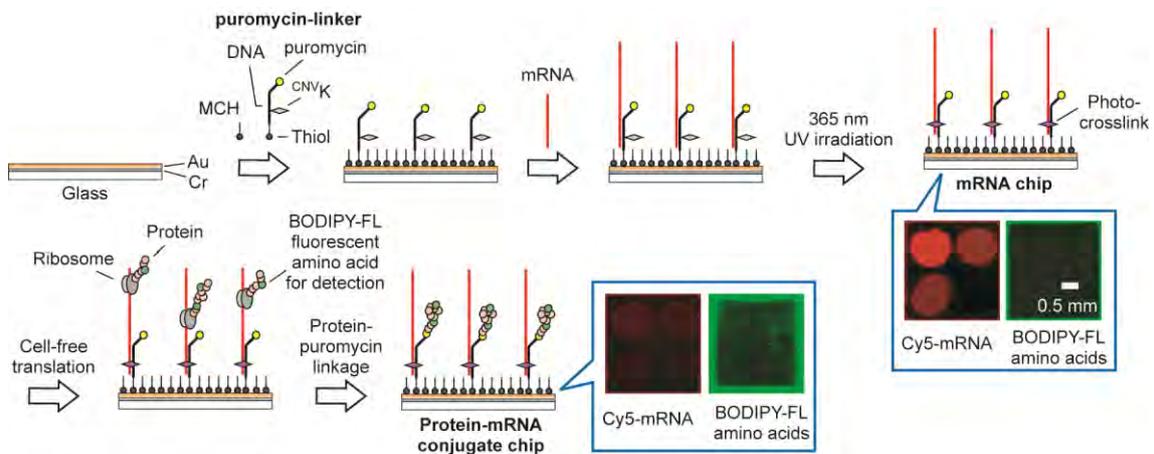


図 10 CNVK を含む光開裂型リンカーを用いる DNA 回収

2-8. 大規模スクリーニングチップ用アミノ基修飾基板の作製

無細胞合成システムのアレイチップ上で生体分子機能を評価する場合、実際には、マイクロアレイクター中で合成されたタンパク質を基板にプリントして、基板上の分子を評価する。広い領域で局所的な評価を行い、比較するためには、大面積に亘って表面状態が均一で、特異的に生体分子を固定できる基板を準備するのが評価の信頼性・再現性の鍵となる。

固定化基板にはシランカップリング剤 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)でアミノ基修飾し、さらに N-Hydroxysuccinimide (NHS)を介してマレイミド化したガラスを用いる。修飾プロセスにおける APTES の調製には、一般にトルエンなどの有機溶媒が用いられるが、残留溶媒の影響が懸念される。一方、水を溶媒にするとアミノ基終端表面の均一性と平坦さがトルエン溶媒に及ばないとされるが、生体分子に無害であり、環境に対して低負荷、疎水性の残留分子による反応阻害が生じないなどのメリットがある。また、将来的に有機材料を基板とする場合にも対応できる。しかしながら、有機溶媒と同レベルの表面修飾を行うには複雑な反応を制御する必要があり、現時点では水系溶媒での修飾条件の詳細な検討が不足している。水中でのシランカップリング剤の吸着・結合は複雑で、APTES は加水分解されてシラノールとなり、部分的に縮合したオリゴマーとして基板表面のヒドロキシル基に水素結合で吸着する。その後、脱水縮合反応してヒドロキシル基と共有結合を形成し、表面に固定される。加水分解と縮合反応の速度は溶液条件に大きく左右されることが知られており、pH や温度などの作製条件を選ぶことにより、表面状態をコントロールできる。大規模スクリーニング基板としては、凹凸のない平坦な表面のほうが適していると考えられるため、単層膜の作製条件を検討した。原子間力顕微鏡(AFM)、アミノ基反応性蛍光試薬、X 線光電子分光を用いて、表面の均一性・平坦さ、アミノ基の分布と活性を比較した。更に thiol-DNA-Cy5 及び DNA-Cy5 をアミノ基修飾表面に作用させ、Cy5 の蛍光強度からチオール-マレイミド結合を介さない非特異吸着の割合を求めた。まず、APTES 修飾反応液の pH を変えると分子末端の極性が変わり、加水分解と縮合の反応速度が変化する。pH4-4.5 の範囲であれば、凝集が小さく全面に広がっており、平坦性が高く、活性アミノ基の量も多いことが分かった。再現性が良く、活性アミノ基量が多く、非特異吸着が少ない修飾反応温度は、60-70°Cであった(図 11)。反応液の昇温速度が速くなると、凝集物は大きくなり、縮合反応に大きな影響を及ぼすことが分かった。また、検出可能な表面アミノ基の密度を得るには、0.5%以上の APTES 水溶液濃度、60°C以上の反応温度が必要であった(図 12)。これらを総合して最適条件を求め、分子レベルで平坦なアミノ単分子膜を作製した(図 13)。

b)

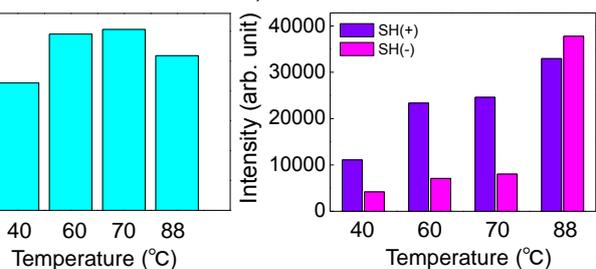


図 11 APTES 修飾反応温度とDNAの表面吸着の関係。DNA へのチオール修飾の有無を SH(+),SH(-)で示す。

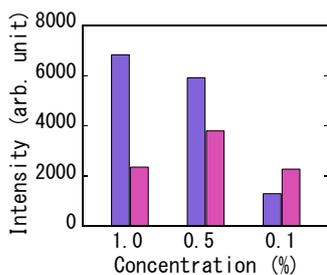


図 12 APTES 濃度とDNAの表面吸着の関係。DNA へのチオール修飾の有無を SH(+),SH(-)で示す。

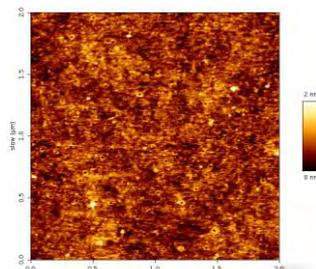


図 13 分子レベルで平坦なアミノ単分子膜(AFM 像)

3. マイクロアレイスクリーニングシステムの開発

2 節では変異体ライブラリーをチップ上にアレイ集積する技術について述べた。本節では、高集積マイクロアレイのプラットフォーム上で変異体ライブラリーを淘汰するための方法論と装置について述べる。変異体ライブラリーの淘汰は、着目する機能について個々のタンパク質を評価し、続いて優れた機能を有するタンパク質の構造情報をもつ DNA を選択的に回収することで実践される。マイクロアレイスクリーニングシステムは耐熱性分子獲得に必要な淘汰圧を負荷する為の 100°Cま

で昇温可能な温度制御ステージ、分子機能の高効率解析のための蛍光顕微イメージャーならびにチップ上での選択的な分子回収システムで構成される(図 14、15)。以下、分子機能の高効率解析のための蛍光顕微イメージャーならびにチップ上での選択的な分子回収技術について述べる。

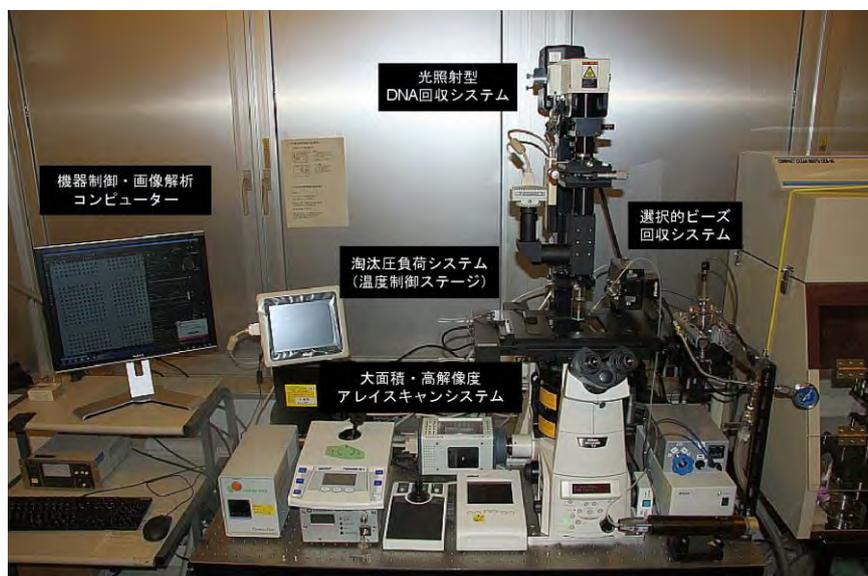


図 14 マイクロアレイクリーニングシステムの概観

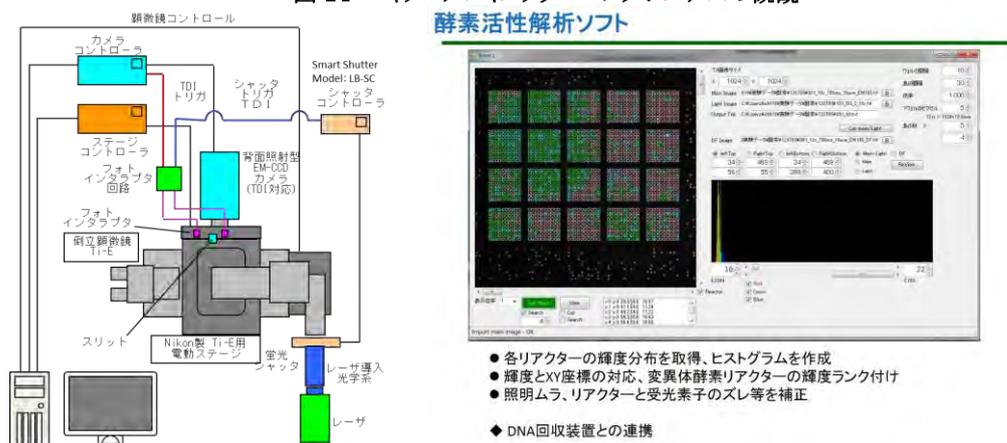


図 15 アレイスキャンシステム構成図(左)、酵素活性解析ソフト(右)

3-1. 蛍光顕微イメージング

従来のタンパク質やペプチドマイクロアレイにおいては、基板上に多数配置されたタンパク質やペプチドに対して標的分子(低分子化合物あるいはタンパク質等)を反応させた後にチップを洗浄し、標的分子が結合しているスポットの位置を特定することで、標的分子に対して強い親和性(アフィニティ)を有する分子を見出す。標的分子が結合しているスポットを検出するために予め標的分子を蛍光分子で標識しておくことが一般的であり、マイクロアレイの蛍光イメージを取得し、解析するための専用装置はマイクロアレイリーダーと称され、市販されている。一方、 μm 級のマイクロウェルアレイを用いると酵素反応を非常に高感度に計測できる。具体的には、マイクロウェルにより個々の分子に与えられた独立した反応空間内で、反応の進行に伴う pH 変化を電気的に計測する、あるいは、発蛍光性基質分子の消費量を光学的に計測することで、ごく微量の酵素分子の反応を定量的に評価できることが報告されている。

つまり、マイクロアレイチップ上の生体分子の分子特異的な結合能や酵素機能は、いずれも光

学的に定量評価することが可能であり、高集積マイクロレイ上での変異体タンパク質ライブラリーの機能スクリーニングにおいても蛍光イメージングは最も有用な方法である。ただし、現在市販されているマイクロレイチップリーダーの性能では、筆者らが開発したような高集積チップ (10^7 - 10^8 個/チップ) の迅速な読み取りが困難なため、従来の装置を超えるマイクロレイリーダーの開発が必要である。そこで、高効率・高感度な顕微蛍光イメージング方式のマイクロレイリーダーの実現可能性を検討するために、ステップ&リピート型、スキャナー型のマイクロレイリーダーの試作機開発が行なわれてきた。装置の基本構成は倒立顕微鏡を用いた顕微光学系、撮像系、励起用レーザー光源、マイクロリアクターアレイチップを固定する調温可能な電動ステージ、機器制御ならびにデータ解析のためのコンピューターから成る。TDI (Time Delay Integration)読み出し型の背面照射型 EM-CCD(電子増倍型 CCD)を用い、検出器のライン読み出し速度とチップの物理的移動速度を同期させて、蛍光イメージを取得する顕微イメージャーでは、60 mm角チップを約5分で全域スキャンし、25メガのマイクロレイチップの解析に利用可能な解像度を有する蛍光画像を取得できた。例えば、酵素反応の活性の評価では、基質消費量の時間変化を計測する必要があるため、一定の時間インターバルで全ての変異体を複数回イメージングするタイムラプス計測が必要であるが、本試作機による技術検討の結果は、 10^7 - 10^8 のライブラリー規模でこれが可能であることを示している。上記マイクロレイリーダーで取得した画像は、専用に開発した画像解析ソフトに取り込み、各スポットの酵素活性を解析する。本ソフトでは、高活性酵素を有するスポットをソーティングし、順位付けする。さらに高活性酵素を有するスポットの座標と顕微鏡ステージを連動することによって、DNA回収装置の直下に高活性酵素含有スポットを移動することが可能である。

3-2. 分子回収技術

マイクロアレイチップ上で選択されたタンパク質の遺伝子型情報(DNA)を回収する技術について述べる。筆者らが開発した高集積マイクロアレイチップ技術においては、タンパク質の遺伝型情報は①マイクロインタリオプリント法の鏡像関係により「アレイ番地」を介して DNA ビーズマイクロアレイと対応付けられている。もしくは、②cDNA ディスプレイ(IVV)アレイチップではタンパク質と同一のチップの同じアレイ位置に DNA が物理的に結合して存在している。したがって、マイクロアレイからの選択的な DNA 回収技術には 2 つのアプローチが考えられる。①の場合には、**図 16(上)**に示すようにプロテインマイクロアレイチップ上で分子機能の評価を行った後、DNA ビーズマイクロアレイチップ上の対応する「アレイ番地」に存在する担体ビーズを個別に回収することで遺伝子型情報を選択的に回収できる。②の場合には、cDNA ディスプレイ(IVV)アレイチップ上でのタンパク質の機能評価に引き続き、選択したアレイ位置に直接連結されている DNA を回収する技術が必要になる。そこで、cDNA ディスプレイ形成用リンカーに光開裂機能を付与し、局所的なレーザー照射により任意の位置の cDNA を基板から切断し、回収する技術が開発された。**図 16(下)**は cDNA 合成を行った mRNA マイクロアレイチップ上で行われた選択的な cDNA 回収のモデル実験の例を示す。光を用いてチップ上の分子を選択的に回収するアプローチは、光を用いて酵素活性を評価する工程と整合性が高く、自動装置による高効率化にも適していると考えられる。以下、光を用いる DNA 回収の原理検証実験の詳細を記す。前述したニトロベンジル基を付与した光開裂型のピュロマイシンリンカーを根本グループと一木グループの共同で考案し合成した(p15 参照)。このリンカーで修飾した基板の上にマイクロインタリオプリント法により mRNA をパターン固定した。ここで用いた mRNA は Cy5 修飾してあり、基板上に固定されていれば顕微鏡下で存在が確認できる。また、Cy5 は光切断に用いた 377 nm の光をほとんど吸収しないため、レーザー照射実験において光退色は問題にならないことを確認した。**図 16**に示すようにレーザー照射部ではリンカーの切断が確認され、mRNA 固定基板の直上にアミノ基修飾したガラスを配置した状態で光開裂を行うと、切断された分子が緩衝液中を拡散して、アミノ基修飾ガラスに吸着される。これを高イオン強度のバッファーで洗浄すると吸着分子が回収される。

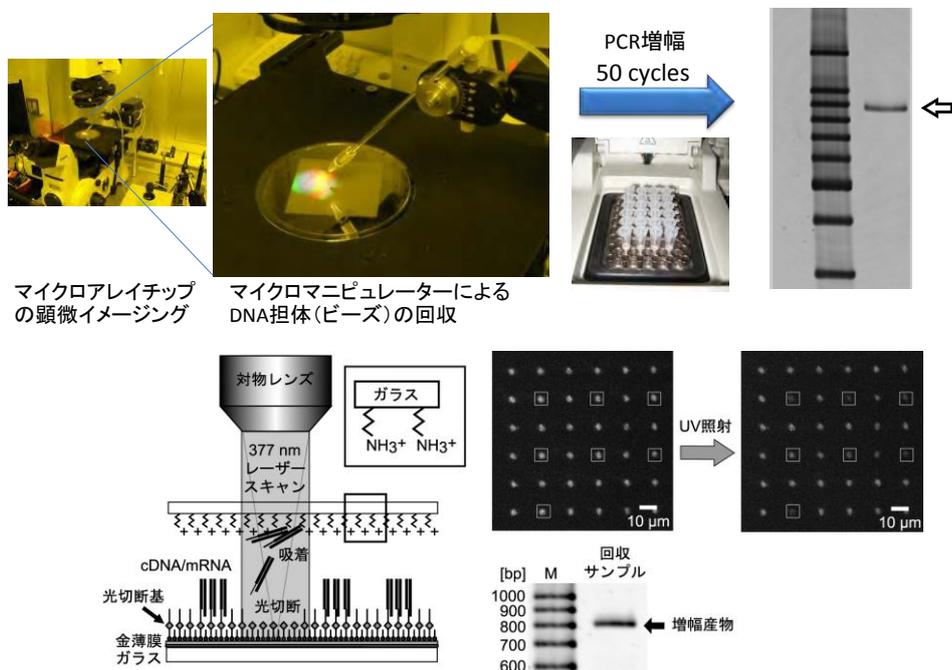


図 16 マイクロアレイチップ上での選択的 DNA 回収技術. (上)ビーズ担体上の DNA の回収. (下)光開裂リンカーで連結された DNA のレーザー照射による回収

3-3. マイクロウェルアレイチップへの送液システム

シリコン製マイクロウェルアレイ上に配列した磁気ビーズ上固定化DNAを元に、タンパク質を合成するが、その際、無細胞転写・翻訳反応液を、DNA 固定化磁気ビーズを配列したアレイ上に展開した後、オイルで無細胞反応液をウェル内に封入し、各ウェルを隔離反応空間とする作業が必要となる。この操作は手作業で行うことも可能ではあるが、再現性や時間、コストの面から手作業で行うことは現実的ではない。そこで、上記作業を簡便に低コストで実行することが可能な送液デバイスを用いたシステムの開発を進めている。

送液デバイスの素材として、耐有機溶媒性の高いポリカーボネートをベース素材とし、顕微鏡での観察部位に関しては、自家蛍光を持たず光学的観察に適した透明性を有するシクロオレフィンポリマーを採用する複数素材の組み合わせとした(図 17 右下)。

流路は切削加工機を用いて作製した。送液方法はデバイス流路内に導入した各溶液を真空ポンプで吸引する方法を採用した。送液する溶液の内容および送液順序は、1. 疎水性表面を持つウェル内を親水化し無細胞転写・翻訳反応液をウェル内に導入しやすくするため、及びウェル内に導入した無細胞反応液に蓋をしてウェル外への漏出を防ぐリン脂質溶液、2. 無細胞転写・翻訳反応液、3. 無細胞反応液をウェル内に封入する高粘度シリコンオイル(シリコン製マイクロウェルアレイへの吸収抑制を目的として動粘度 1000 cst の高粘度オイルを採用した)で行うことが最適であることを条件検討の結果導いた(図 17 上)。

シリコン製マイクロウェルアレイとポリカーボネート製デバイスとの接着が不十分な場合、溶液の漏れや大気の影響が生じる。デバイス上でタンパク質を発現させ、活性解析を行った後、DNA 固定化磁気ビーズを回収する為にこの接着は再度剥がす必要があり、脱着可能な接着方法が求められる。そこで、送液流路周辺に真空吸引用の流路を形成させ、真空チャック方式を採用した。

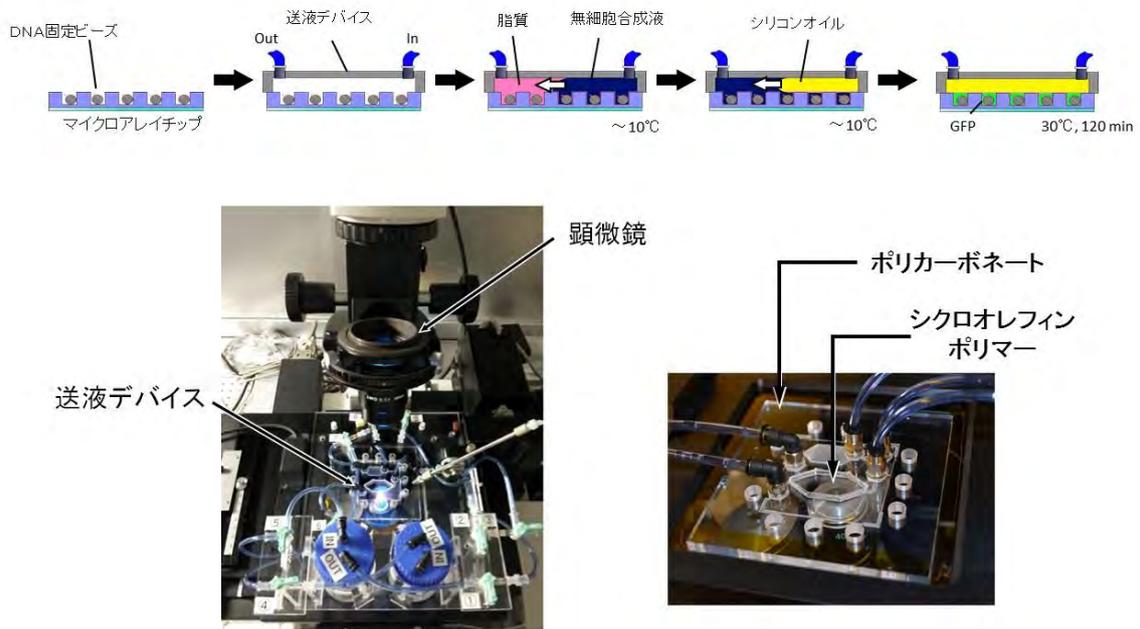


図 17 送液システム

4. 小規模ライブラリーをモデルとする進化サイクル実施可能性の検証

チップ上に集積したマイクロリアクター内で変異体 DNA から変異タンパク質を無細胞合成し、ライブラリー中から選別したタンパク質の遺伝子情報を回収して、次世代のライブラリーを作製する工程を繰り返し、チップ上で高効率に分子進化を行う方法論の実施可能性を小規模の GFP ライブラリーを用いて検証した。

GFPuv4 の発色団の一部である 65 番目のアミノ酸(スレオニン)のコドンランダム塩基配列で置換した変異体 DNA をライブラリーのモデルとして作製した。この DNA を 1 分子種ずつ増幅して固定したビーズアレイチップを作製した後、チップ上の各リアクター内に無細胞合成系を導入するとともにオイルを用いて各リアクターを独立した「セル」にし、30°C で 120 分間保持し、発光性の異なる GFP を合成した。その後、顕微鏡下で蛍光を発したセル中の遺伝子情報である DNA 担体ビーズをマニピレーターでピックアップして回収し、ビーズごと PCR 増幅を行い第 2 世代の DNA ライブラリー作製の DNA を得た(図 18)。

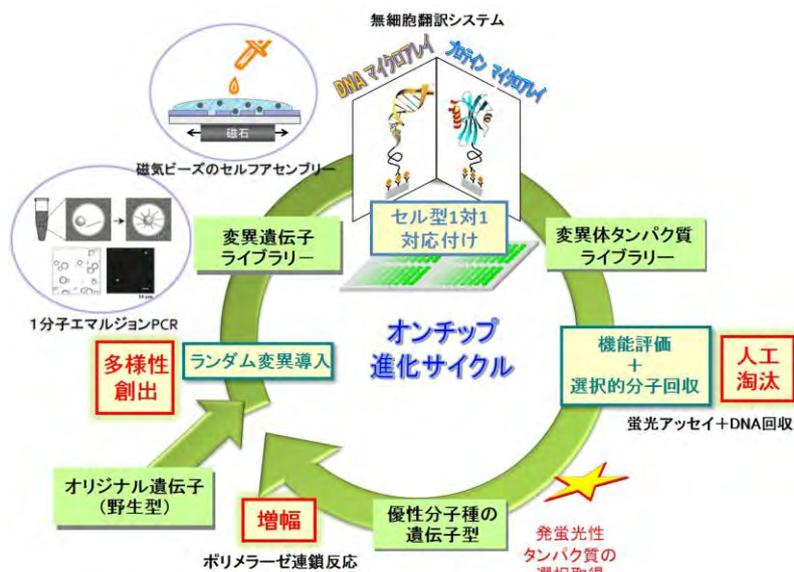


図 18 チップ上での進化サイクルの実施可能性検証の工程

図 19 は変異体 DNA アレイチップと無細胞合成を行った後に得られる変異 GFP アレイの顕微鏡像を示す。エマルジョン PCR を行う際に用いるプライマーの末端に Cy5 を修飾してあるため、DNA は Cy5 修飾されており、全てのビーズにほぼ均一に DNA が固定されていることが赤い輝点がほぼ均一であることから分かる。一方、合成された GFP は発色団にランダム変異を導入したことから 488 nm のレーザー光で励起すると蛍光を発するものと、発しないものが生じている。なお、磁気ビーズと無細胞合成系からも自家蛍光が生じるため、全ての点から蛍光が検出されるが、輝度の違いは明確に認められる。

チップ上の各アレイからビーズを個別に取り出すことで、そのアレイの遺伝子情報が得られる。各ビーズに固定されている DNA 分子数の定量的評価はまだであるが、1個のビーズを採取した場合にも 50 サイクルの PCR 増幅により十分な量の DNA が回収できることが確認された。

最後に発光性の GFP の DNA のみを用いて、DNA ビーズアレイチップを作製し、GFP を再度発現させると図 20 のように全てのアレイ位置で蛍光を発することが確認された。以上をまとめると、以下ようになる。

- (1) 4 μm 級微小ウェルアレイに変異 DNA ライブラリーを配置、さらに無細胞合成系を用いて転写、翻訳を行い、変異体 GFP ライブラリーを一括作製。
- (2) 顕微イメージングで選別した優性種の DNA を回収し、PCR 増幅。

- (3) 増幅した DNA から第 2 世代ライブラリーをチップ上に作製。
- (4) セル型進化リアクター上での人工淘汰による優性種エンリッチメントを確認。

つまり、本モデル実験により、セル型進化リアクター上で生体分子の操作・合成・評価を行い、分子進化サイクルを進めることが可能であることが示された。

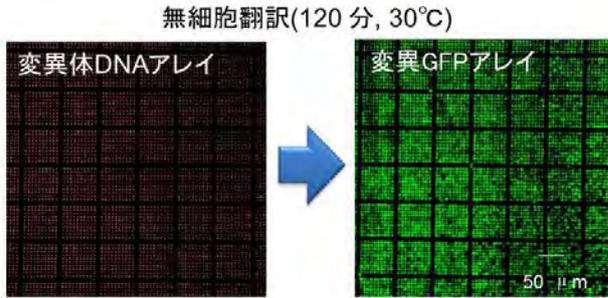


図 19 変異体 GFP アレイ作製と蛍光イメージング。

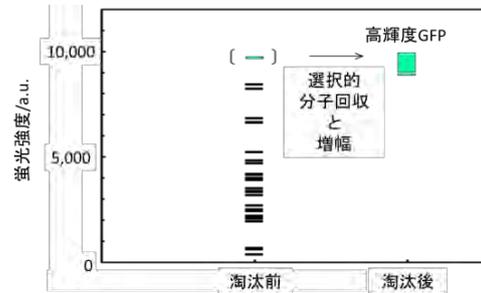


図 20 高輝度GFPの人工淘汰。変異体GFPライブラリーの淘汰後、高輝度GFPのみが選択的回収されていることがわかる

5. オンチップ分子進化に向けて(GFP、酵素分子(BGL)を例に)

5-1. ライブラリー作製

進化分子工学における人工分子進化実験を成功させるには変異体ライブラリーの設計が重要である、一般的に、生体高分子は進化が進行するにつれ、活性が向上する変異体が出現する可能性は低くなるものと考えられる。すなわち、ある程度進化した分子は、変異体ライブラリーの構成分子数を一定とした場合、変異導入率を上げるほど活性が低下する変異体の割合が上がり、活性が向上する変異体の割合は下がるものと考えられる(図 21)。

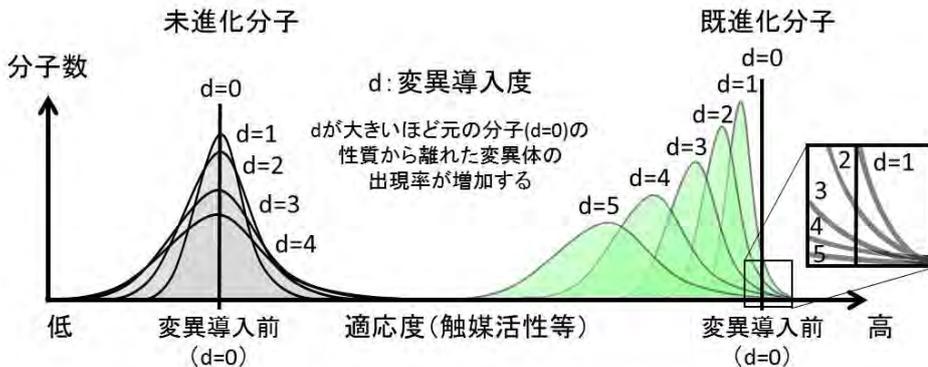


図 21 進化の進行度による変異導入度と適応度分布の関係の概念図。変異体ライブラリーの構成分子数を一定にした場合での分子の適応度分布を示す。横軸を適応度(分子の触媒活性等)、縦軸をその適応度を持つ分子の頻度とする。分布の面積がライブラリーの構成分子数を示す。変異導入度 d が大きいほど、変異導入前のオリジナルの分子($d=0$)から遠く離れた適応度を持つ変異体の出現率が上がり、分布の分散が大きくなる。全く機能を有していない未進化の分子に変異を導入した場合、適応度が上がる変異体と下がる変異体の出現率はほぼ等しいと推測できるため、より適応度の高い変異体を得るために高い変異導入度を採用する戦略がとられる。しかしながら、自然淘汰によって既に進化している分子は適応度地形の山頂付近にいる(これ以上進化する余地が限られている)と想定でき、その場合変異導入度が高いほど適応度が下がる変異体の出現率が増加する。そのため、適応度が上昇する変異体の出現率を上げるためには、低い変異導入度で変異体ライブラリーを作製する戦略が採られる。

即ち、既に自然淘汰によってある程度進化が進行している既存の酵素を元に変異体を作製する場合、出来るだけ低い変異導入率で、実験で扱える変異体数をカバーする変異体ライブラリー

を作製することが得策であると考えられる。モデル実験で扱う GFP の遺伝子の場合、DNA1 塩基の置換によってアミノ酸置換が発生する確率は 0.58 であり、その置換によって発生するアミノ酸の多様性は平均 2.31 種である。従って、GFP 遺伝子 237 アミノ酸長における変異体発生量は、1 遺伝子あたりの置換塩基数 3 の場合、 $(0.58 \times 2.31)^3 \times 237 C_3 = 5.27 \times 10^6$ 。置換塩基数 4 の場合、 $(0.58 \times 2.31)^4 \times 237 C_4 = 4.13 \times 10^8$ となり、本プロジェクトで扱う 2500 万種 (2.5×10^7 種) の変異体ライブラリーを作製するには、1 遺伝子あたりの塩基置換数が 4 の変異体ライブラリーを作製すればよいことが分かる。

DNA に塩基置換変異を行う際、ある特定の狙った位置に集中的に変異を導入する方法と、配列全体にランダムに変異を導入する方法がある。GFP に関しては既に発色団形成やフォールディング能に関与する変異体が得られており、その変異箇所も判明しているが、既存の改良 GFP の高機能化を目的として、発色団形成やフォールディング能に関して未だ発見されていない変異箇所を探索するために、配列全体にランダムに変異を導入する方法を選択した。変異導入方法として、ポリメラーゼの塩基取込みの正確性を下げて PCR を行うエラープロン PCR 法を採用した。エラープロン PCR の条件を検討することにより、1 遺伝子あたりの平均塩基置換数が 4 となる実験条件を決定し、GFP の変異体ライブラリーを作製した(図 22)。現在このライブラリーを用いて実際に人工進化の実験を進めている。p.18「3. マイクロアレイスクリーニングシステムの開発」で述べた温度制御ステージによって高温環境を用意し、新規耐熱性 GFP の獲得を目指している。

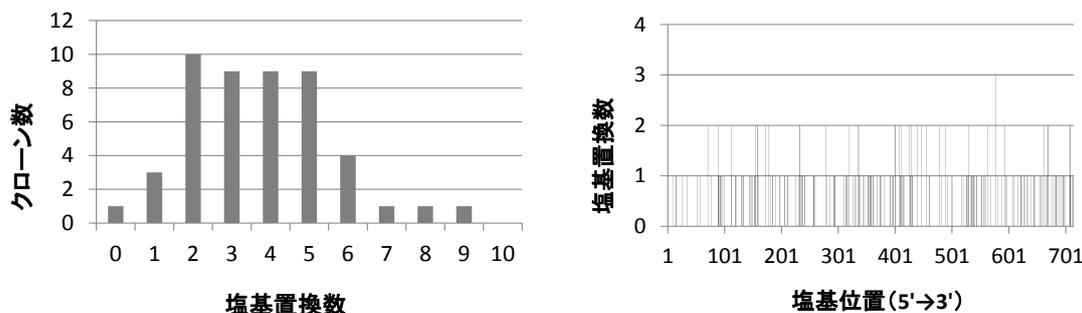


図 22 GFP 変異体ライブラリー作製結果. (左)塩基置換発生数、(右)塩基置換発生箇所

進化させる酵素として β -グルコシダーゼ(BGL)を考えているが、BGL に関しては優れた変異体がまだ得られていないことから、上記エラープロン PCR によって作製したライブラリーに加えて、活性部位アミノ酸近傍に変異を加えることで活性向上が示唆される文献 (*Appl. Biochem. Biotechnol.* **161**: 301-312, 2010) を元に、インバース PCR を用いて、部位特異的に変異導入を行ったライブラリーの作製も行った(図 23)。



図 23 BGL 活性部位アミノ酸近傍への変異導入結果. BGL に 2 カ所存在する活性部位のアミノ酸の両隣、計 4 カ所にランダム変異を導入した。

5-2. マイクロウェル内壁固定型酵素マイクロアレイの作製

1 分子エマルジョン PCR によって DNA を磁気ビーズ上に固定化する技術である BEAMing は本来、変異遺伝子の検出や、次世代シーケンサーでの使用を目的とした技術であり固定化する DNA の鎖長は 100 bp 程度を想定している。本プロジェクトでは、1000 bp 以上になる酵素遺伝子の全長配列を固定化する必要があるが、鎖長が長くなるほど体積排除効果により固定化量が減少することが考えられた。そこで、DNA の鎖長と磁気ビーズ上への固定化量の検討を行った。10-3000 bp の DNA をエマルジョン PCR によってビーズ上へ固定化し、DNA 蛍光染色試薬 SYBRGold を用いて DNA を蛍光染色、ビーズの蛍光強度を測定することで相対的な DNA 固定化量を見積もった。その結果、DNA の固定化量は DNA の鎖長にほぼ反比例し、ポリマーの体積排除効果から見積もった固定化 DNA 分子数の理論値 $\frac{4\pi(1.4\mu m + R_g)^2}{\pi R_g^2}$, $R_g = N^{0.588} \times b$, R_g : 慣性

半径、N: セグメント数、b: Kuhn length (dsDNA の場合 100 nm/290 bp) とほぼ一致し(図 24)、長鎖 DNA の磁気ビーズ上への固定化を確認した。

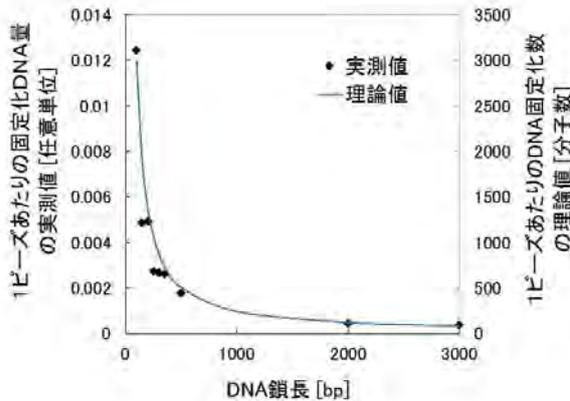


図 24 磁気ビーズ上に固定された DNA 量と DNA 鎖長との関係

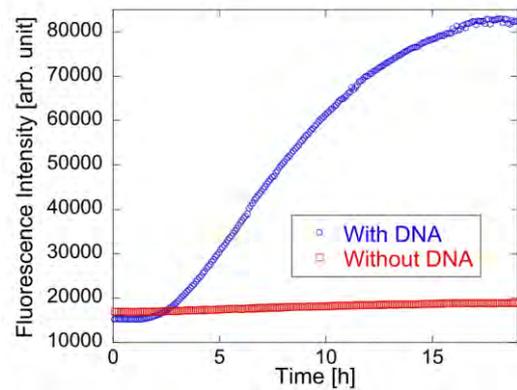


図 25 磁気ビーズ上に固定された DNA から発現した BGL の酵素活性

続いて、磁気ビーズ上に固定化した BGL 遺伝子(非翻訳領域も含む 1648 bp)から BGL を発現させその活性を観測したところ、触媒活性を有する BGL が発現できていることが確認でき(図 25)、磁気ビーズ上に固定化した DNA から活性を有する酵素を発現することが可能であることを確認した。

マイクロウェルアレイを用いて酵素の進化実験を行う場合、マイクロウェルアレイ上で無細胞転写・翻訳反応液を用いて酵素を発現した後、ウェル内の溶液を酵素反応解析用溶液に交換する必要があるが、そのためには、溶液交換を行っても酵素がウェル内に留まる必要がある。そこで、ウェル内で発現した酵素がウェル内部表面に結合することで、溶液交換を行ってもウェル内に留まるような実験系を設計した。

具体的には、石英ガラスをドライエッチングすることによってマイクロウェルアレイを作製し、石英ガラス製マイクロウェルアレイ表面に Ni-NTA を修飾した。このマイクロウェル中で無細胞転写・翻訳反応を行うことで、DNA から BGL を合成した。その際、BGL の 3' 末端に Histidine-tag(His-Tag)を付加しておくことで、合成された GFP が His-Tag と Ni-NTA の親和力を介して、マイクロウェルの表面に結合するようにした(図 26 左)。翻訳反応後の溶液交換後も BGL がウェル内に固定化されて残存していることを蛍光標識した BGL を用いることで確認した(図 26 右)。

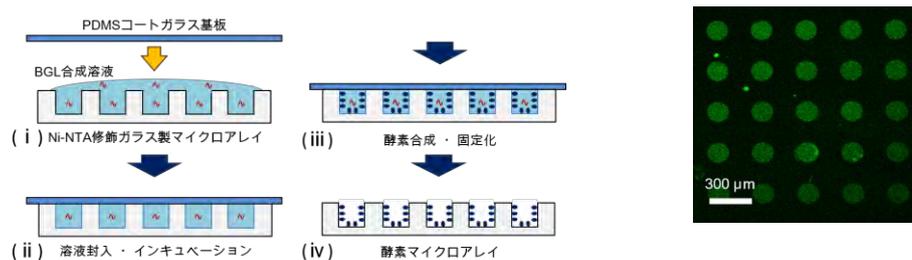


図 26 酵素マイクロアレイ. (左)作製法 (右)アレイに固定化された BGL の蛍光像

次に、BGL が固定化されたウェルに BGL の蛍光基質(Resorufin- β -glu)(図 27a)を含む活性測定溶液を封入し、固定化 BGL の酵素活性を観測した。その結果、時間経過とともに、基質分解によって生じる蛍光の輝度が上昇することを確認し、ウェル表面に固定化された BGL が酵素活性を保持していることを確認した(図 27b,c)。本研究成果によって、本プロジェクトにおいて作成したマイクロウェルアレイシステムが酵素の活性測定にも適用できることが示された(特願 2013-180693)。

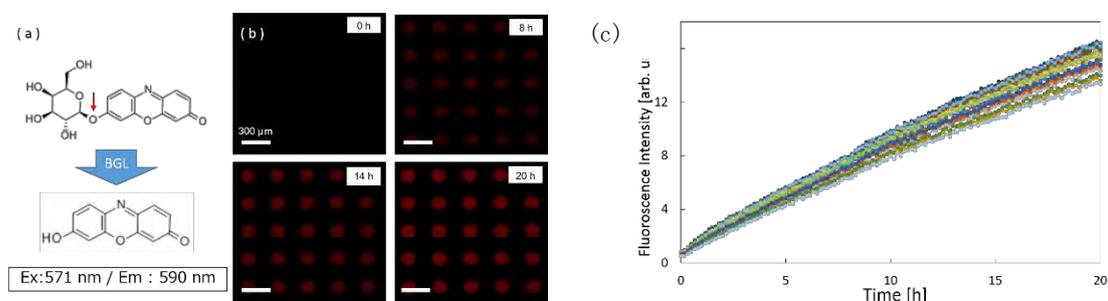


図 27 アレイに固定化された BGL の酵素活性. (a) Resorufin- β -glu の BGL による分解反応 (b) Resorufin 封入後の観測結果 (c) Resorufin 蛍光強度の推移

4.2 cDNA ディスプレイ技術の拡張・高機能化(埼玉大学 根本グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

進化分子工学における cDNA ディスプレイ (J. Yamaguchi, et al., *Nucleic Acids Res.* **37**: e108, 2009) のようなウイルス型の遺伝子型-表現型対応付け技術は抗体医薬等に応用され大きな成功を収めた。しかしながら、もう一つの応用分野である産業用酵素分野においては大きな進展が得られていない。これはディスプレイ技術が膨大なライブラリサイズを利用できる技術にもかかわらず、そのライブラリサイズの酵素機能評価系と結びつけることが困難であったことによる。近年の微細加工技術や1分子イメージング等のいわゆるナノテクノロジーはこの状況を一変させた。マイクロサイズの“小さな試験管”を用いて少数の分子で機能評価することができれば cDNA ディスプレイで扱うライブラリサイズでも機能評価が可能になり、従来の数 10^3 レベルから 10^7 レベルと飛躍的に効率を向上させることが可能になる。そのためには従来の親和性による選択を目的とする cDNA ディスプレイ自体も酵素のような触媒活性を評価可能とする形態に適合するようデザインを変更する必要がある。本研究では cDNA ディスプレイ技術のピューロマイシン・リンカーに様々な工夫をすることでナノテクノロジーにより可能となった酵素機能評価系に応用できる形態を完成させた。

1. プロセス簡略化のための cDNA ディスプレイの One-pot 調製法

マイクロサイズの小スケール空間においては粘性や表面張力の影響で従来のような cDNA ディスプレイの調整のための多段階の溶液交換は不可能である。溶液交換なしに材料を加えるだけで cDNA ディスプレイを合成する方法論を確立した。新規リンカーはビオチン部分の切断に必要な酵素を制限酵素 *Pvu* II から RNA 分解酵素 RNaseT1 に変更した(図1)。これにともない制限酵素認識部位の代わりに DNA 中に rG 塩基がビオチン部位を挟む形で近接して2箇所に導入すればよいため合成に要する長さは半分になった。この結果、収量がほぼ 2 倍、コストは半分になり、複数のステップで反応効率を数倍以上向上させることができた。次に新規リンカーを用いてチップ上でタンパク質を固定化するプロセス全般を検討した。その結果、1) mRNA とリンカーのハイブリダイゼーション 2) mRNA とリンカーの連結 3) 精製 4) 無細胞翻訳 5) mRNA-タンパク質連結 6) RNA カラム精製 7) 逆転写の各ステップで効率化し、従来すべてのステップには 3 時間を要していたが、これを 25 分で行うことが可能になり実用化に向けて大きく前進した。特に今回プロトコルを綿密に検討したところ従来必須と考えられていた6)の RNA カラム精製が図2のように割愛できることを見出した(精製しなくても mRNA-タンパク質連結体の合成量は同じ)(特願 2009-219348, Y. Mochizuki, et al., *ACS Comb. Chem.* **13**: 478–485, 2011)。また、最近はさらに収率も大幅に改善された(Y. Mochizuki, et al., *Biol. Proced. Online*: **15**, 7, 2013)。

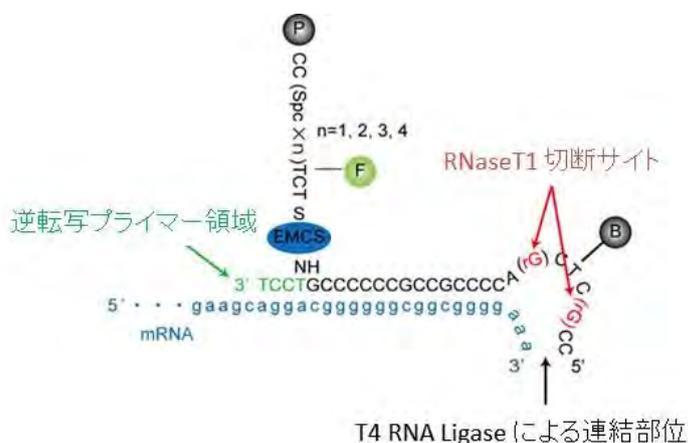


図1 RNaseT1を用いる新規リンカーの構造

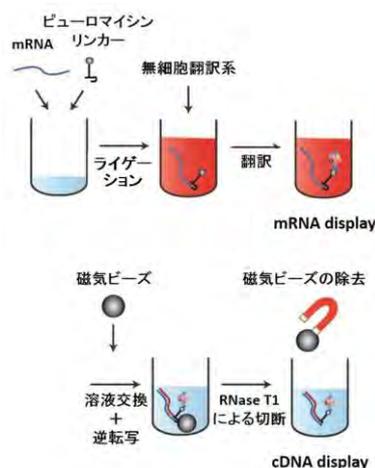


図2 cDNA ディスプレイの One-pot 合

2. RNA 分解酵素を用いない安定かつ効率の良いリンカーの開発

マイクロアレイ上でタンパク質を発現・固定化する際に重要なピュロマイシン・リンカーの改良を行った。すでにビオチン部分の切断に使用する酵素を制限酵素 *Pvu* II から RNA 分解酵素 RNaseT1 に変更し、配列設計を最適化することによって cDNA-タンパク質連結体の作製時間を大幅に短縮することが出来たが、RNA 分解酵素の実験系への残留・混入によって、cDNA-タンパク質連結体作製過程で用いる RNA 分子が分解されてしまう懸念があった。また、リンカー配列中に RNA が挿入されていることから、翻訳反応液中に存在している RNA 分解酵素によってリンカー自体が分解される可能性もある。そこで、切断酵素として損傷 DNA の修復酵素 Endonuclease Vによって特異的に認識・切断されるデオキシイノシン(dI)をRNAの代わりに挿入したリンカー(図3)を考案し、その効果を検証した。その結果、今回作製したリンカーは、以前ものと同様の切断効率、タンパク質連結効率を有しつつ、RNase 耐性を持っていることが確認できた(図4)。これにより、ハイスループットスクリーニングが可能で、かつ化学安定性も向上したリンカーを作製した。このリンカーは、耐熱性酵素等を獲得する上で必要となる厳しい実験条件での使用が可能であることから、重要な技術であるため特許出願した。(特願 2011- 608, S. Ueno, et al., *J.*

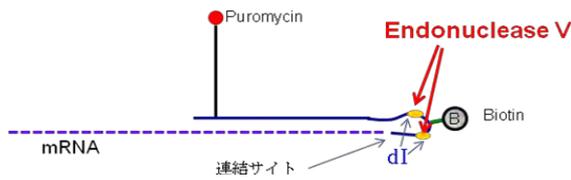


図3 新規リンカーの構造

固相結合部位であるビオチンを挟んでデオキシシノシンが配置してあり、Endonuclease Vによって切断される。

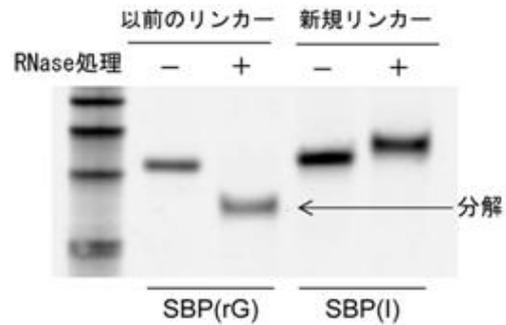


図4 新規リンカーのRNase耐性

従来のリンカーは分解されるが新規リンカーは分解されない。

3. マイクロリアクター用 cDNA ディスプレイリンカー

マイクロアレイリアクターに向けた実用的なリンカーとして、回収に必要な光切断及びビオチン・アビジン以外の固定化(金基板にチオール基により結合)を検討した。特に、リボソームや酵素との立体障害や光学特性を考慮し基板とライゲーション連結部位を自由に調節できるようなリンカーデザインを一木グループと共同で考案した(P16, 図9 参照)(特願 2011-242789、特願 2011-242790)。

4. 酵素進化用リンカーの開発とそれを用いた進化モデル実験系の確立

セルラーゼ等の分解酵素の高速進化を目標に新しい酵素進化用リンカーを開発した(図5)(特願 2011 - 177076)。このリンカーの特徴はリンカーそのものに酵素の基質を導入したことである。cDNA ディスプレイにより翻訳された分解酵素が近傍にあるリンカー内部の基質に作用し切断することで遺伝子部分(cDNA)が切り出される。

今回はモデルとしてより扱いやすいプロテアーゼを用いた。活性の高いプロテアーゼほど早く基質を分解するため cDNA が溶出される。このため短い時間で PCR される遺伝子をスクリーニングすることで活性の高いプロテアーゼを取得できる(図6)。しかしながら、通常の試験管中では溶出されたプロテアーゼがランダムに他の固定化されている基質を分解するため、本研究テーマであるマイクロリアクター型のチップ内でスクリーニングすることが望ましい。

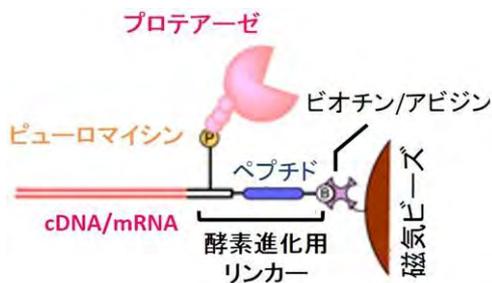


図5 酵素進化用リンカーの概略図

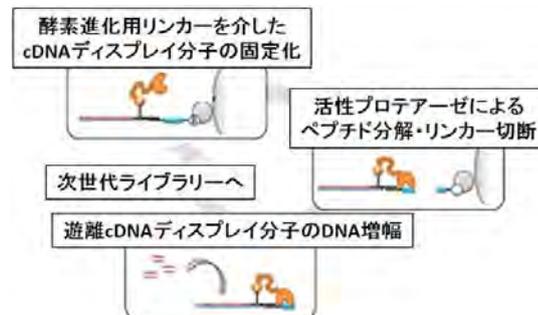


図6 酵素進化用リンカーを用いた進化サイクル

まず、本研究で明らかにしたことは、基質であるペプチドはタンパク質を合成後、ハイブリダイゼーションによって連結させる必要があるということであった。これは酵素が合成後、すぐに活性を持つ場合特に重要である(図7)(特許出願準備中)。これらの改良の後、具体的に世界最小のメタロプロテインである Matrix metalloproteinase-7(MMP7), Matrilysin のドメインを用いてモデル実験を行った(図8)。ネガティブコントロールとしてプロテアーゼ活性のない Pou-domain(PDO)を用いて、比較実験を行った。この結果、図9にあるように Mini-MMP7 の遺伝子が時間経過とともに磁気ビーズから遊離されることが、回収溶液中に存在する遺伝子の PCR 増幅によって確認された。これはこの型の酵素スクリーニングが世界で最初に確認されたことになる。今後、実際に Mini-MMP7 に変異を加えた酵素ライブラリーを作製し、世界最小の活性の高いメタロプロテアーゼの取得を進める予定である。

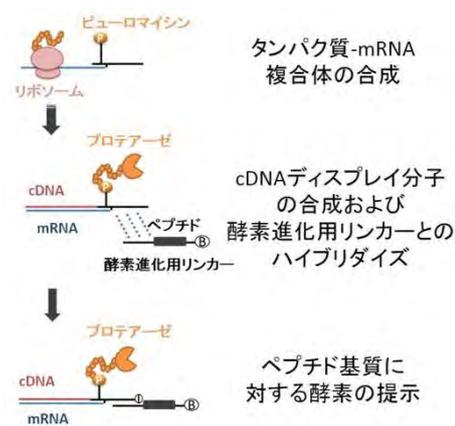


図7 酵素進化用リンカーの改良

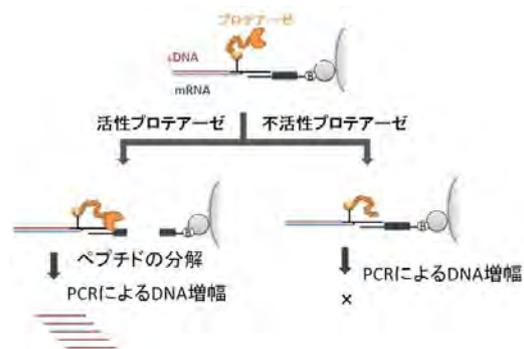


図8 酵素進化のモデル実験

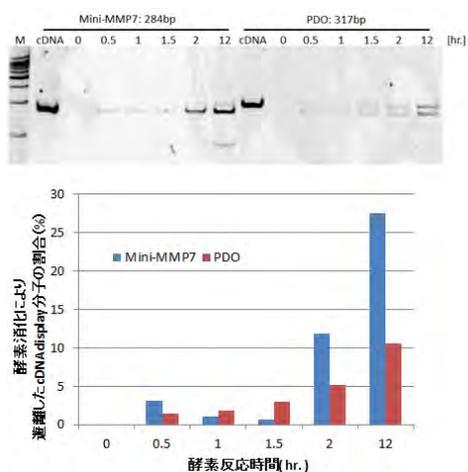


図9 Mini-MMP7を用いたモデル実験

ネガティブコントロールの PDO タンパク質の遺伝子に比べ、Mini-MMP7 の遺伝子が時間とともに早く溶液中に遊離してきた。

4.3 タンパク質機能の1分子イメージングによる高感度スクリーニング法の開発(東京大学船津グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1 次スクリーニングは、いかに効率よく目的の変異体酵素の候補を選別するかが最大の課題である。これに対し、2 次スクリーニングは候補として選別した変異体酵素の活性をいかに正確に求めるかに主眼がおかれる。通常 2 次スクリーニングでは、精製した変異体酵素を用い、その活性の再評価を行う。しかしこれは膨大な時間と労力を有する作業であり(各変異体につき、1-2 週間程度)、進化の速度を人工的に飛躍的に向上させることを目指す本研究課題において看過できない問題である。そこで、無細胞タンパク質合成系および 1 分子計測技術を組み合わせ、酵素活性を迅速に定量する 2 次スクリーニング法の開発を試みた。無細胞タンパク質合成系を用いれば、変異体酵素を数時間程度で調製することができる。これまでに行われてきたように、変異体酵素を大腸菌で大量に組換え発現させ、何本もカラムを通して精製する必要はない。また酵素 1 分子のターンオーバー計測が実現できれば、数時間程度で定量的なデータを得ることが可能となる。

1..GFP のスクリーニング法の開発

分子進化のパイロット実験として、GFP の分子進化を計画した。そこで、1分子イメージングを利用した GFP の蛍光強度・蛍光スペクトル・発色団の形成速度に関するアッセイ法を開発した。1分子の GFP をイメージングすることで、発現量・発色団形成効率に依存しない蛍光強度の定量解析を実現した。また、顕微鏡の光路に屈折率の異なる 2 枚のプリズムを貼り合わせた素子を挿入することにより 1 分子の GFP スペクトルを得ることに成功した(図 1)。GFP は 3 次元構造を形成するや否や蛍光を発するのではなく、蛍光性を獲得するまでにある程度の時間を要する。この時間は、分子内に発色団が形成される過程に相当する。無細胞タンパク質合成系を用いて酸素濃度が低い状態で GFP を合成し、その後で酸素濃度を上げ、蛍光性になるのに必要な時間を測定することに、1 分子(Iizuka et al., *Methods Mol. Biol.* **778**: 215-228, 2011) および多分子の系で成功した(Iizuka et al., *Anal. Biochem.* **414**: 173-178, 2011)。特に発色団の形成速度を調べるアッセイ法の有用性は高く評価されており、その論文は頻繁に引用されている。

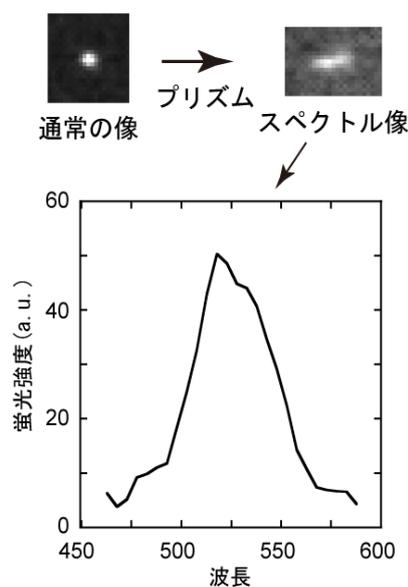


図 1 GFP1 分子の蛍光スペクトル

2.β-グルコシダーゼのスクリーニング法の開発

本研究開発の最終目標である高機能の β-グルコシダーゼのスクリーニングに必要なアッセイ法を、2 種類開発した。アッセイ法の開発には、白色木材腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来 β-グルコシダーゼ(BGL1B)を用いた。

(1) BGL1B の調製

アッセイ法の確立に必要な BGL1B は、大腸菌で組換え発現させることで得た。全長の BGL1B は大腸菌での組換え発現が困難であったが、特定の構造を持たないと思われる C 末端の 63 残基切除することで可溶性画分に大量発現させることに成功した(以下、この変異体を BGL1BΔC63 と呼ぶ)。また BGL1BΔC63 の C 末端にビオチン付加配列(AviTag)を付与し、大腸菌内で BGL1BΔC63 をビオチン化させることに成功した。精製した BGL1BΔC63 は、既報の野生型と同様のセロビオース分解活性を有することを確認した。

また、無細胞タンパク質合成系を用いた BGL1B の調製の検討も行った。無細胞タンパク質合成系(PURE system)に Cy5 およびビオチンを結合させたピュエロマイシンを添加することで、C 末端に Cy5 およびビオチンを有する BGL1BΔC63 を合成することに成功した。その際、BGL1BΔC63 の C 末端に RGAA 配列を付与すると、合成量が増大させることができた。

(2) マイクロチャンバーを用いた β-グルコシダーゼ活性の光学的高感度アッセイ法の開発

本アッセイ法は、直径・深さが数 μm(体積は fL 程度)のマイクロチャンバー内に β-グルコシダーゼと分解されると蛍光を発する基質(発蛍光性基質)を封入し、その反応を蛍光顕微鏡下で検出するというものである。β-グルコシダーゼが無蛍光の基質を 1 分子加水分解すると蛍光色素が 1 分子遊離するため、酵素反応をマイクロチャンバー内の蛍光強度の増大として測定することができる。チャンバー内に封入する β-グルコシダーゼを数分子程度にすれば、1 分子あたりの活性を定量的に測定することが可能となる。このアッセイ法により、BGL1BΔC63 の酵素活性を 1 分子レベルで高感度に測定することを試みた(一木グループとの連携)。

まず、チャンバーの材質として PDMS (Polydimethylsiloxane) とガラス、発蛍光性基質として TokyoGreen-βGlu と Resorufin-β-D-glucopyranoside を比較検討した。PDMS チャンバーを用いた場合、酵素反応の結果生じる蛍光色素(TokyoGreen, Resorufin)が PDMS に染み出してし

まい、酵素活性の測定には適していなかった。ガラスチャンバーの場合、溶液をガラスチャンバーアレイの上に載せ、ミネラルオイルで蓋をして BGL1BAC63 をマイクロチャンバーに封入した(図 2)。脂溶性の高い TokyoGreen はミネラルオイルに溶け出すという問題が起こったが、Resorufin は水溶液中に留まり BGL1BAC63 の酵素活性を 1 分子レベルで測定することに成功した(図 3)。またこの測定に要した時間は、1 時間程度であった。以上より、迅速かつ定量的に β -グルコシダーゼ 1 分子の酵素活性を計測することができることが、実験的に証明された。

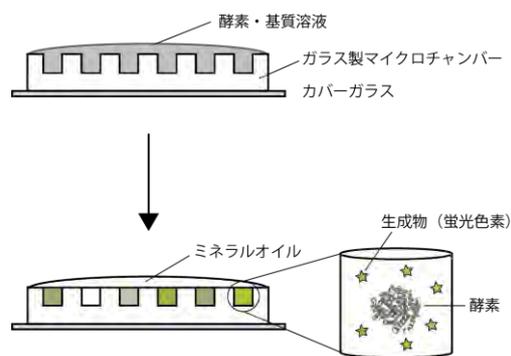


図 2 ガラス製マイクロチャンバーを用いた β -グルコシダーゼ活性のアッセイ法

酵素・基質溶液をチャンバー上に添加した後、ミネラルオイルを重層し、余分な溶液・ミネラルオイルを取り除く。これにより、酵素・基質溶液をチャンバー内に封入することができる。

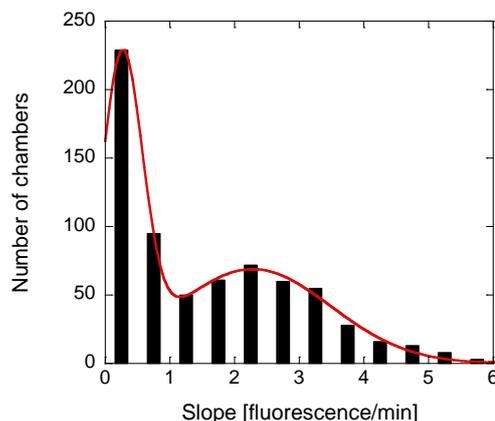


図 3 マイクロチャンバーを用いた β -グルコシダーゼ活性の光学的高感度アッセイ

各チャンバーの蛍光強度の分布は量子化されており、左から 0 個、1 個の β -グルコシダーゼ分子を含むチャンバーに由来するピークに相当する。ここで、0 個の場合の分解は Resorufin- β -D-glucopyranoside の自発的な分解を示している。

(3) ナノ開口を用いた β -グルコシダーゼ活性の 1 分子イメージング法の開発

分子進化させた β -グルコシダーゼの性質をより詳細に理解するためには、 β -グルコシダーゼによる酵素反応のターンオーバーを 1 分子レベルで解析することが望ましい。これを実現するため、 β -グルコシダーゼを基板上に固定し、蛍光標識セロビオースが結合・解離する様子を追跡することを考えた。BGL1BAC63 のセロビオースに対するミカエリス定数 (K_m) は約 200 μ M であり、一般的な 1 分子蛍光イメージング法(全反射照明法)ではその反応を観察することは困難である。そこで、ナノ開口基板を用いた 1 分子蛍光イメージング法を適用した。

蛍光標識セロビオースの調製

1 分子イメージングに先立ち、蛍光標識セロビオースを調製した。 β -グルコシダーゼは、基質の非還元性末端の構造を厳密に認識するのに対し、還元性末端の構造に対する認識は甘い。そこで根本グループと連携して、セロビオースの還元性末端を伸長し、アミノ基を導入したものを合成した。これに 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester を反応させ、TMR-セロビオースを調製した(図 4)。この TMR-セロビオースは、セロビオースと同様の速度で BGL1BAC63 により加水分解された。

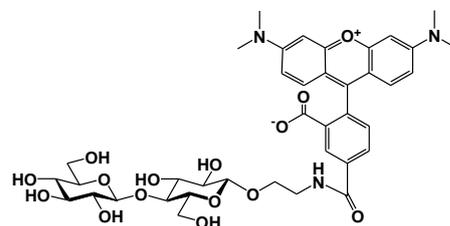


図 4 TMR-セロビオースの構造

ナノ開口の形状の検討・作製プロセスの改良

シミュレーションおよびその検証実験により、ナノ開口の石英ガラスを 60 nm エッチングすることでエッチングを施していない基板に比べて S/N 比を大きく向上させることができることを見出した

(Tanii et al., *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **88**: 012727, 2013)。これを利用し、大腸菌のシャペロニン GroEL とその補因子 GroES の結合・解離反応の 1 分子イメージングを行い、生理的な条件下では形成されないと考えられていた複合体(フットボール型複合体)が反応サイクル中に存在することの直接観察に成功した(Sameshima et al., *J. Biol. Chem.* **285**: 23159-23164, 2010)。これは、従来のシャペロニン反応サイクルのモデルに修正を迫る発見である。

ナノ開口基板は作製に電子ビームを用いるため、大量に生産できないことが問題であった。この問題を解決するため、ナノインプリントと紫外線露光を組み合わせることによりナノ開口基板の量産化を実現した(Wada et al., *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**: 06GK07-06GK07-5, 2011)。

β-グルコシダーゼ活性の 1 分子蛍光イメージング

ビオチン化 BSA、ストレプトアビジンを介して掘り下げ型ナノ開口内にビオチン化 BGL1BAC63 を固定し、観察溶液中に存在する TMR-セロビオース(1 μM) の結合・解離を観察した(図 5)。溶液中をブラウン運動する TMR-セロビオースは輝点として検出できないが、BGL1BAC63 に結合した TMR-セロビオースは輝点として観察された。すなわち、酵素-基質(ES)複合体の直接観察が可能となった。

図 6A に、開口内の蛍光強度の経時変化の一例を示す。輝点が出現してから消失するまでの時間を結合時間(ES 複合体の寿命)と定義し、統計解析を行った。その結果、ES 複合体は主として速い反応($\tau_1 = 24.0$ ms)あるいは低頻度で起こる遅い反応($\tau_2 = 237$ ms)を経て消失することが分かった(図 6B)。反応阻害剤であるグルコース存在下において同様の実験を行ったところ、グルコース濃度増加とともに ES 複合体の形成頻度・加水分解反応の割合が低下するとともに、加水分解反応が

遅延した(図 6C)。この結果から、グルコースは非競合的に反応を阻害する(BGL1BAC63 の基質結合部位とは別の部位に結合し、セロビオースの代謝回転速度を低下させる)ことが示唆された。

以上より、このアッセイ法では β-グルコシダーゼの反応の各過程を定量的に評価することができ、□次スクリーニングに非常に有用であると言える。

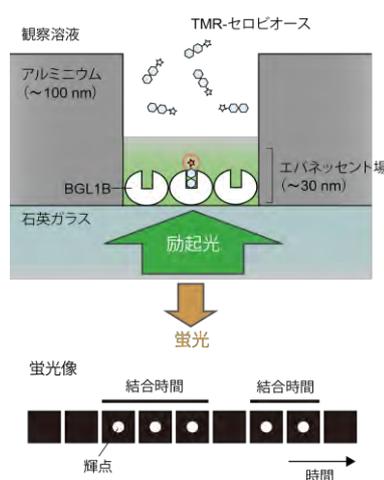


図 5 実験系の模式図

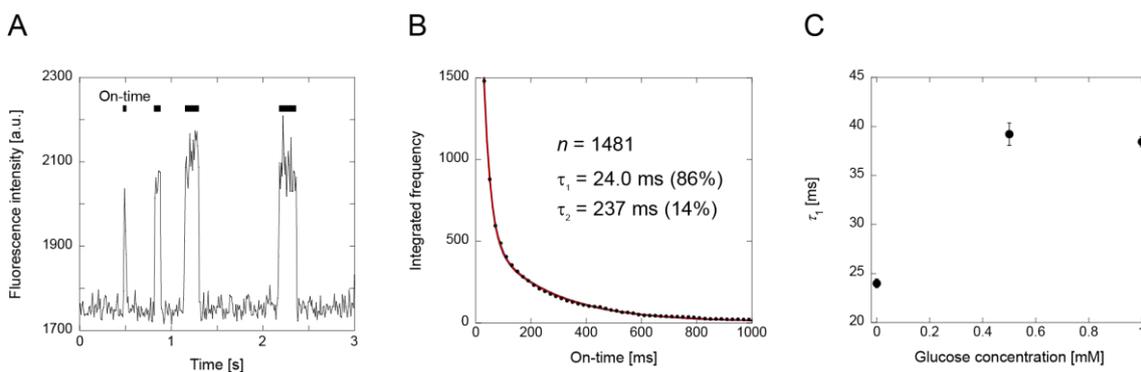


図 6 (A) 開口内の蛍光強度の経時変化、(B) 結合時間の累積度数分布、(C) グルコース存在下・非存在下における BGL1BAC63 の τ_1 (エラーバーはフィッティングエラー)

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 37件)

1. M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, "One-to-one gene-encoded functional protein microarray.", Proceedings of The Twelveth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2008), pp. 1781-1783 (2008).
2. T. Ono, T. Akagi and T. Ichiki, "Anisotropic Etching of Amorphous Perfluoropolymer Films in Oxygen-Based Inductively Coupled Plasmas", J. Appl. Phys., vol. 105, p. 13314 (2009).
3. Y. Hosoi, T. Akagi and T. Ichiki, "Development of microreactor array chip-based measurement system for massively parallel analysis of enzymatic activity", Electron. Commun. Jpn., vol. 92, pp. 35-41 (2009).
4. T. Ono, T. Akagi and T. Ichiki, "Hydrophilization of amorphous perfluoropolymer using low-pressure argon plasma", J. Photopolymer Sci. Technol., vol. 22(5), pp. 683-689 (2009).
5. J. Yamaguchi, M. Naimuddin, M. Biyani, T. Sasaki, M. Machida, T. Kubo, T. Funatsu, Y. Husimi, and N. Nemoto, "cDNA display: A novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions" Nucleic Acids Res., vol. 37, p. e108 (2009). doi:10.1093/nar/gkp514
6. M. Biyani, T. Osawa, S. Mohri and T. Ichiki, "Self-assembled molecular lithography using femtoliter microreactor array-mold", Proceedings of The Thirteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2009), pp. 734 -736 (2009).
7. T. Ono, T. Akagi and T. Ichiki, "Microfabrication and surface treatment technologies of amorphous perfluoropolymer films and its application to micro TAS device fabrication", Proceedings of The Thirteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2009), pp. 1665-1667 (2009).
8. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, T. Funatsu, "Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex" Biochem. J., vol. 427, pp. 247-254 (2010). (DOI:10.1042/BJ20091845)
9. M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki, "DNA-linked protein array for high-throughput proteomics: from spatially unknown DNA arrays to identifiable protein arrays" Nano LIFE, vol. 1, pp. 33-43 (2010).
10. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, J. Wada, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Tanii and T. Funatsu, "Single-molecule study on the decay process of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides", J. Biol. Chem., vol. 285, pp. 23159-23164 (2010). (DOI: 10.1074/jbcM110.122101)
11. M. Biyani, S. Sato, T. Fujita, T. Akagi, and T. Ichiki, "Kilo-to-giga DNA microarray for conversion high-density protein microarray on-demand", Proceedings of The Fourteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2010), pp. 734-736 (2010).
12. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu, and T. Ichiki, "Damage-free microfabrication of transparent perfluoropolymer for single-molecule imaging device", Proceedings of The Fourteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2010), pp. 1187-1189 (2010).
13. M. Biyani, M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki, K. Nishigaki, Y. Husimi, "Gel shift selection of translation enhancer sequences using messenger mRNA display" Anal. Biochem., vol. 409, pp. 105-111 (2011).
14. M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, "Microintaglio printing of mRNA and

- its application to in situ production of mRNA display microarray”, *Appl. Phys. Express*, vol. 4, p. 047001 (2011).
15. J. Wada, S. Ryu, Y. Asano, T. Ueno, T. Funatsu, T. Yukawa, J. Mizuno, T. Tanii, “Fabrication of zero-mode waveguide by ultraviolet nanoimprint lithography lift-off process”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 50, p. 06GK07 (2011). (DOI:10.1143/JJAP.50.06GK07)
 16. R. Iizuka, M. Yamagishi-Shirasaki, and T. Funatsu, “Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins”, *Anal. Biochem.*, vol. 414, pp. 173-178 (2011) (DOI:10.1016/j.ab.2011.03.036)
 17. Y. Mochizuki, M. Biyani, S. Tsuji-Ueno, M. Suzuki, K. Nishigaki, Y. Husimi, and N. Nemoto “One-pot preparation of mRNA/cDNA display by a novel and versatile puromycin-linker DNA”, *ACS Comb. Sci.*, in press.
 18. R. Iizuka, T. Ueno, N. Morone, T. Funatsu, “Single-Molecule Fluorescence Polarization Study of Conformational Change in Archaeal Group II Chaperonin.”, *PLoS ONE*, vol. 6, No. 7, e22253, (2011). (DOI: 10.1371/journal.pone.0022253)
 19. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, "Damage-free Fabrication of Perfluoropolymer Microaperture Array Device for Single-molecule Imaging", *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, vol. 36, pp.553-556, 2011.
 20. Biyani, R. Kobayashi, S. Sato and T. Ichiki, "Molecular screening on a chip by DNA-displayed protein microarray", *Proceedings of The Fifteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2011)*, pp. 1457-1459 (2011).
 21. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, "Nanofabrication of polymeric aperture array for localized illumination beyond diffraction limit", *Proceedings of The Fifteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2011)*, pp. 1801-1803 (2011).
 22. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki, "On-chip synthesis of mutant GFP library using ultra-large self-aligned DNA-bound beads microarray", *Proceedings of The Fifteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2011)*, pp. 765-767 (2011).
 23. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki, “Photoassisted recovery of DNA molecules for on-chip directed evolution”, *J. Photopolymer Sci. Technol.*, vol. 25, pp. 67-72, 2012.
 24. S. Ueno, S. Kimura, T. Ichiki, N. Nemoto, “Improvement of a puromycin-linker to extend the selection target varieties in cDNA display method”, *J. Biotechnol.*, vol. 162, pp. 299-302, 2012.
 25. Y. Takei, R. Iizuka, T. Ueno, T. Funatsu. “Single-molecule observation of protein folding in symmetric GroEL-(GroES)₂ complexes”, *J. Biol. Chem.*, vol. 287, pp. 41118-41125, 2012. (DOI: 10.1074/jbc.M112.398628)
 26. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki “Artificial darwinian selection technology on microarray chips towards directed evolution using single molecule processing”, *Proceedings of The Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2012)*, pp. 124-126 (2012).
 27. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki “Spot-selective DNA recovery from DNA microarray chips for on-chip directed evolution”, *Proceedings of The Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2012)*, pp. 1300-1302 (2012).
 28. Y. Tanaka, M. Biyani, T. Akagi, T. Ichiki “High-throughput protein microarrays: feature size effects on printing arrays with in situ protein synthesis”, *Proceedings of The Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2012)*, pp. 1297-1299 (2012).
 29. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu, and T. Ichiki “Single-molecule imaging device using localized evanescent illumination in polymeric nanoholes”,

- Proceedings of The Sixteenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2012), pp. 1294-1296 (2012).
30. S. R. Kumal, M. Biyani, S. Ueno, T. Akagi, T. Ichiki, "Simultaneous synthesis and biotinylation of proteins using puromycin-based labeling technology for fabrication of protein array chip", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **52**, 06GK09 (2013).
 31. Y. Mochizuki, F. Kohno, K. Nishigaki, N. Nemoto, "A pull-down method with a biotinylated bait protein prepared by cell-free translation using a puromycin-linker" *Anal. Biochem.*, **434**, 93-95 (2013)
 32. Y. Mochizuki, S. Kumachi, K. Nishigaki, N. Nemoto, "Increasing the library size in cDNA display by optimizing purification procedures." *Biol. Proced. Online*, **15**, 7 (2013)
 33. T. Tanii, R. Akahori, S. Higano, K. Okubo, H. Yamamoto, T. Ueno, T. Funatsu "Improving zero-mode waveguide structure for enhancing signal-to-noise ratio of real-time single-molecule fluorescence imaging: a computational study" *Phys. Rev. E* vol. **88**: pp. 012727, (2013) (DOI: 10.1103/PhysRevE.88.012727)
 34. M. Biyani, J. Moriyasu, Y. Tanaka, S. Sato, S. Ueno T. Ichiki, "Microintaglio Printing of In Situ Synthesized Proteins Enables Rapid Printing of High-Density Protein Microarrays Directly from DNA Microarrays", *Appl. Phys. Express*, **6**, 087001 (2013).
 35. S. Ueno, R. Kobayashi, M. Biyani, T. Ichiki, "Protein-dna conjugate array chip for on-chip directed evolution", *Proceedings of The Seventeenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2013)*, 1463-1465 (2013)
 36. S. Sato, T. Fukuda, T. Hirai, S. Ueno, M. Biyani, T. Akagi, T. Ichiki, "fabrication of planar microfluidic device for artificial darwinian selection technology", *Proceedings of The Seventeenth International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2013)*, 1460-1462 (2013)
 37. M. Biyani, Y. Tanaka, S. Sato, S. Ueno, T. Ichiki, "Evaluation of poly(dimethylsiloxane) microreactors for pattern size miniaturization of microintaglio-printing-based protein microarray", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **53** (accepted).

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 船津高志、「1分子蛍光イメージングによる生体分子の機能解析」、創薬科学の魅力 -東京大学大学院薬学研究科からの発信-(杉山雄一、柴崎正勝、長野哲雄、松木則夫編)、廣川書店、pp.209-222. (2010). 2010/02/19
2. 一木隆範、「バイオチップの実用化」、テクノシステム(2010). 2010/04/19
3. 一木隆範、「ナノバイオチップ技術を利用する高速酵素分子進化システム創製」、未来材料 10 巻 10 号(2010). 2010/10
4. R. Iizuka, T. Funatsu, and S. Uemura, "Real-Time Single-Molecule Observation of Green Fluorescent Protein Synthesis by Immobilized Ribosomes", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 778, pp. 215-228, 2011 (DOI: 10.1007/978-1-61779-261-8_14)
5. 一木隆範、「バイオチップ技術の細胞工学, タンパク質工学への展開」、応用物理 2 月号 (2011) 2011/02
6. S. Ueno and N. Nemoto, "cDNA display: rapid stabilization of mRNA display", *Methods in Mol. Biol.*, vol. 805, Humana Press, 113-135 (2012).
7. Y. Mochizuki and N. Nemoto, "Evolution of disulfide-rich peptide aptamers using cDNA display" *Methods in Mol. Biol.*, vol. 805, Humana Press, 237-250 (2012).
8. N. Nemoto, S. Kimura, S. Kumachi, W. Cai, M. Suzuki, K. Nishigaki, T. Kubo, "In vitro Selection of Peptide Aptamers against Acetylcholine-binding Protein (AChBP) from Disulfide-rich Peptide Library by cDNA Display" *Peptide Science 2011: K. Sakaguchi(Ed.)* pp.89-90 (2012).

9. R. Iizuka, T. Funatsu, S. Uemura, "Real-Time Single-Molecule Observation of Green Fluorescent Protein Synthesis by Immobilized Ribosomes", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 778, pp. 215-228, 2011.
10. M. Biyani, M. Biyani, N. Nemoto, Y. Husimi, "Evolutionary Molecular Engineering to Efficiently Direct in vitro Protein Synthesis", in *Cell-free protein synthesis* (Ed. Manish Biyani), pp. 51-62, 2012.
11. M. Biyani, T. Ichiki, "Solid-phase cell-free protein synthesis to improve protein foldability", in *Cell-free protein synthesis* (Ed. Manish Biyani), pp. 77-88, 2012.
12. 一木隆範、進化分子工学—高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発—、第2編4章 分子機能評価技術：高集積マイクロアレイチップ技術を利用する高速分子進化システムの開発 (2013).
13. 根本直人、進化分子工学の最前線—高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発—、第2編3章 遺伝子型表現型対応付け技術 (2013)
14. 根本直人、望月佑樹、上野真吾、「cDNA display による分子デザイン—mRNA display (in vitro virus)から cDNA display へ—」 *生物物理* vol. 53, No.5, pp. 250-253, 2013
15. 船津高志 2013 「単一分子計測とバイオフォトニクス」 *化学工業* vol. 64, No.8, pp. 38-43.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

①招待講演 (国内会議 32件、国際会議 20件)

1. 船津高志、白崎善隆、杉野弘和、上野太郎、上村想太郎、「ナノ・マイクロデバイスによる生体分子の分離・回収と1分子機能解析」、第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、12月9日～12日 (2008).
2. 船津高志、「生体分子機能の1分子イメージング」、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、神戸、5月18日～19日 (2009).
3. 船津高志、「生体分子機能の1分子蛍光イメージング」、第22回九州分析化学若手の会春の講演会、福岡、5月23日 (2009).
4. *T. Ichiki, "Nanobiodevice technologies for protein engineering", The 1st World Congress of International Academy of Nanomedicine, Hainan, China, June 12-13 (2009).
5. T. Funatsu "Sorting and functional analysis of single biomolecules by micro- and nano-devices", 22nd International Microprocess and Nanotechnology Conference, Sapporo, Japan, November 16-19 (2009).
6. 一木隆範、「プラズマで拓くナノバイオテクノロジー」、プラズマエレクトロニクスインキュベーションホール、御殿場、9月18日 (2009).
7. T. Ichiki, "New directions in nanobio-device technologies", BISMA-Biotech 2009: Bionanotechnology and Health care in the Developing World, India, September 21 (2009).
8. 一木隆範、「機械工学・精密工学はバイオ=複雑系をどう扱うか」、第61回日本生物工学会、名古屋、9月25日 (2009).
9. T. Ichiki, "Combined platforms for optical and electrical cell analysis based on microchip technology", Third Annual Global Symposium on NanoBio Technology, California, USA, November 19 (2009).
10. 一木隆範、「ナノバイオ・医療におけるプラズマ技術の展開」、第26回プラズマ・核融合学会年会シンポジウム、京都、12月1日 (2009).
11. 船津高志、「ナノ・マイクロデバイスによる生体分子の分離・回収と1分子機能解析」、第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日～12日 (2009).
12. T. Funatsu, "Single-molecule imaging of chaperonin reaction cycle using evanescent field fluorescence microscopy", Single Molecule Biology Symposium, Osaka, Japan, December 15-17 (2009).
13. T. Funatsu, "Sorting and functional analysis of single biomolecules by micro- and nano- devices", 3rd International Bioimaging Symposium, Okazaki, Japan,

- January 18-21 (2010).
14. 一木隆範、「ナノ・マイクロ製造技術のバイオデバイス応用」、ナノ ICT シンポジウム 2010、東京、2月19日 (2010).
 15. 船津高志、「ナノデバイスによる生体分子の機能と相互作用の解析」、ナノ学会第8回大会、岡崎、5月13日～15日 (2010).
 16. 一木隆範、「バイオチップ技術のタンパク質・細胞センシングへの展開」、電気化学秋季大会、神奈川、9月2日 (2010).
 17. T. Funatsu, “Single-molecule analyses of functions and interactions of biomolecules by nano- and micro-devices” Trilateral Symposium on NanoBio Integration, Berlin, Germany, September 30- October 3 (2010).
 18. *T. Ichiki, “Self-assembled DNA microarray for conversion into high-density protein microarray on demand”, 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Munich, Germany, October 5-7 (2010).
 19. T. Funatsu “Single-molecule analyses of functions and interactions of biomolecules by nano- and micro-devices” 4th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Munich, Germany, October 5-7 (2010).
 20. 船津高志、「マイクロ・ナノデバイスによる生体分子の機能と相互作用の1分子解析」、理研・分子研合同シンポジウム第11回エクストリームフォトニクス研究、和光、埼玉、10月12日～13日 (2010).
 21. 船津高志、「マイクロ・ナノデバイスによる生体分子の一分子機能解析」、日本化学会関東支部講演会「ナノバイオテクノロジー」、東京、10月28日 (2010).
 22. T. Funatsu “Single-molecule analyses of functions and interactions of biomolecules by nano- and micro-devices” Screening Asia, Biopolis, Singapore, November 15-16 (2010).
 23. *T. Ichiki, “Microarray technology for protein & cell engineering”, Japan-Taiwan Joint Workshop on Bioelectronics, Tainan, Taiwan, January 21 (2011).
 24. T. Ichiki, “Production of ultra-large-scale cDNA microarray chips for high-throughput functional proteomics”, 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, Nagoya, Japan, January 28 (2011).
 25. 根本直人、「cDNA display 法による新機能分子の創出」、理研シンポジウム第6回「バイオものづくりシンポジウム」、和光、5月11日 (2011).
 26. 根本直人、「抗体に代るペプチドを用いた分子認識材料(ペプチドアダプター)の迅速な創製」、H23年度首都圏北部4大学新技術説明会、千代田区、東京、6月2日 (2011).
 27. 根本直人、「抗体に代るペプチドを用いた分子認識材料(ペプチドアダプター)の迅速な創製」、埼玉大学地域オープンイノベーションセンター産学官協議会、大宮区、さいたま市、6月6日 (2011).
 28. 船津高志、「1分子イメージングによってわかるタンパク質の働き」、日本バイオイメージング学会第20回学術集会公開講座、千歳市民文化センター、千歳市、北海道、8月31日 (2011).
 29. *T. Ichiki, M. Biyani J. Moriyasu, R. Kobayashi, Y. Tanaka and T. Akagi, “Microintaglio Printing Technology for Biomolecular Patterning”, IUMRS-ICA 2011, Taipei, September 19-22 (2011).
 30. 根本直人、「タンパク/ペプチドの簡易で迅速な精製・ビオチン化法」、イノベーション・ジャパン 2011「新技術説明会」、千代田区、東京、9月21日 (2011).
 31. 船津高志、「1分子蛍光イメージング法の開発と予想できなかった展開」、第3回光塾、東京大学大学院薬学系研究科講堂、文京区、東京、10月22日～23日 (2011).
 32. T. Ichiki, “New Bio-Microarray Chip Technologies for High-Throughput Biomolecular Screening”, International Conference of Nanobiotechnology and Microsystem Innovative Industrialization (ICNMII), Chongqing, October 23 (2011).
 33. T. Ichiki, “Ultra-large-scale Integration Technology for high-throughput

- biomolecular screening”, Seoul Nanohealth Symposium 2011, November 17-18 (2011).
34. 一木隆範、「有用生体分子創出のための超大規模マイクロアレイ技術」、第21回日本MRS学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜、12月19日(2011)。
 35. T. Ichiki, “Biological Synthesis on a Large-scale-integrated Microarray Platform”, 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, Nagoya, January 25 (2012).
 36. Y. Mochizuki and N. Nemoto, “Optimization of In Vitro Protein Selection using mRNA/cDNA Display Method to Search Functional Peptides and Proteins Rapidly”, Protein & Peptide Conference2012, Beijing, China, March 25 (2012).
 37. 一木隆範、「大規模集積化アレイデバイスによるハイスループットバイオ合成・解析」、第73回応用物理学会学術講演会、松山大学、松山市、9月11日(2012)。
 38. *T. Ichiki, S. Sato, R. Kobayashi, Y. Tanaka, M. Biyani and T. Akagi, “A Strategy toward the High-Throughput Analysis of Biomolecular Function Using a Large-Scale-Integrated Microarray Platform”, IUMRS Int'l Conf. on Electronic Materials (IUMRS-ICEM2012), Yokohama, September 25 (2012).
 39. 船津高志、「シャペロン GroEL-GroES の反応サイクルに対する再検討」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の新展開と細胞制御」、大阪大学、吹田、大阪、11月15日～16日(2012)。
 40. N. Nemoto, S. Kumachi, M. Suzuki, K. Nishigaki, Y. Husimi, “Searching for Function of Peptides Consisting of Four Kinds of Amino Acids by cDNA Display Method”, 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡、12月11日～14日(2012)。
 41. 一木隆範、「進化分子工学と集積デバイス技術」、第8回理研バイオものづくりシンポジウム、理化学研究所、和光、埼玉、3月8日(2013)。
 42. *T. Ichiki, “Nanobiodevice Technology Toward On-chip Directed Molecular Evolution”, 2nd International Conference on Biomaterials Science, Tsukuba, March 19-22 (2013).
 43. 船津高志、「生体分子の機能と相互作用の1分子蛍光イメージング」、日本薬学会第133年会、パシフィコ横浜、横浜、3月27～30日(2013)。
 44. 船津高志、「マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子の機能と相互作用の解析」、第48回構造生物応用研究会、アークホテル仙台青葉通り、仙台、5月18日～19日(2013)。
 45. 一木隆範、「フォトンクス・バイオ融合」、電子情報通信学会 次世代ナノ技術研究会 材料デバイスサマーセミナー「ナノデバイスを用いたフォトンクスの広がり」、東京、6月21日(2013)。
 46. 一木隆範、「ナノバイオ集積化システムによる分子診断、分子創出」、次世代マイクロ化学チップコンソーシアム第25回研究会、東京、7月24日(2013)。
 47. T. Ichiki, “Large-scale-integrated microarray technology for directed molecular evolution”, JSAP-MRS symposia, Kyotanabe, Kyoto, September 18 (2013).
 48. S. Ueno, “Development of novel mutant of cellulase for sustainable bio-fuel production using directed evolution and nano/micro fabrication technologies” BICON-2013, Jaipur, India, September 23 (2013).
 49. Takanori Ichiki, Shusuke Sato, Manish Biyani, Shingo Ueno, “Microintaglio printing enables to reproduce the central dogma of molecular biology on microarray chips”, International Conference on Surface Engineering (ICSE2013) Busan, Korea, November, 18-20, 2013.
 50. 一木隆範、「バイオデバイス研究の現状と展望」、バイオエレクトロニクス・バイオテクノロジー研究討論会、電子情報通信学会 OME 研究専門委員会、東京農工大学、東京都、2013年12月16日
 51. 一木隆範、「分子診断、分子創出に向けたバイオデバイス・システムの開発」、応用物理学会、有機分子・バイオエレクトロニクス分科会、東京大学、東京都、2014年3月5日

52. 一木隆範、「生体分子の診断、創出に向けたナノバイオ統合システム」、電気学会バイオ・マイクロシステム研究会、東京大学、東京都、2014年3月12日。

① 口頭発表 (国内会議 46 件、国際会議 16 件)

1. 小野堯生、藤田孝紘、岩田要、赤木貴則、一木隆範、「低圧アルゴンプラズマを用いた非晶質フッ素ポリマーの表面親水化」、第 26 回フォトポリマーコンファレンス、千葉、6 月 30 日-7 月 3 日 (2009)。
2. 根本直人、山口淳一、ナウムジンモハメッド、町田雅之、伏見譲、「 $cDNA$ 法によって得られた IL-6R 結合ペプチドアプタマーとその特徴」、第 46 回ペプチド討論、北九州、福岡、11 月 6 日 (2009)。
3. 佐藤秀介、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、吉田泰彦、一木隆範、「エマルジョン粒径分布を考慮した 1 分子 ePCR 条件の検討」、第 57 回春季応用物理学会、神奈川、3 月 19 日 (2010)。
4. 小野堯生、飯塚 怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「透明フッ素ポリマーを用いた 1 分子蛍光イメージングデバイスの作製」、第 57 回春季応用物理学会、神奈川、3 月 19 日 (2010)。
5. 本間啓一郎、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「酵素反応検出における高分子ゲル添加効果の検討」、第 57 回春季応用物理学会、神奈川、3 月 19 日 (2010)。
6. T. Funatsu, “Single-molecule characterization of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides”, Single Molecule Approaches to Biology, Lucca, Italy, June 27- July 2 (2010)。
7. 佐藤秀介、マニッシュ ビヤニ、赤木貴則、吉田泰彦、一木隆範、「大規模化 DNA マイクロアレイチップを目指した 1 分子エマルジョン PCR 技術」第 71 回秋季応用物理学会、長崎、9 月 15 日 (2010)。
8. 森安純平、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「In vitro 転写・翻訳システムを利用したインタリオプリンティング法によるプロテインアレイパターンニング」、第 71 回秋季応用物理学会、長崎、9 月 15 日 (2010)。
9. 小野堯生、飯塚 怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「透明フッ素ポリマーによる全反射照明系を用いた 1 分子蛍光イメージングデバイスの開発」、第 71 回秋季応用物理学会、長崎、9 月 15 日 (2010)。
10. M. Biyani, “Bringing Molecular Diagnostics tools from Bench-to- Bedsides.” 5th Indo-Japan international symposium on Innovative Molecular Approaches in Global Health Research, Jaipur, India, September 25 (2010)。
11. M. Biyani, S. Sato, T. Fujita, T. Akagi, and T. Ichiki, “Kilo-to-giga DNA microarray for conversion high-density protein microarray on-demand”, 14th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2010), Holland, October 3-7 (2010)。
12. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, “Detection of Plasma-Induced Damage on Transparent Polymer Films using Total Internal Reflection Microscopy”, Int. Symp. Dry Process 2010, Tokyo, November 11 (2010)。
13. M. Biyani, “Practical Know-how and Know-why for Engineering Education”, International Conference on Emerging Trends in Engineering & Technology (TechnoBytes2010), Jaipur, India, November 19-21 (2010)。
14. 飯塚怜、船津高志、「新生蛍光タンパク質の発色団形成反応の速度論的解析」、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会、神戸、12 月 7 日～10 日 (2010)。
15. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu, and T. Ichiki, “Micro/nanofabrication of transparent perfluoropolymer for single-molecule imaging device.” 第 20 回日本

MRS 学会シンポジウム、横浜、12月22日(2010).

16. 小野堯生、飯塚 怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「1 分子蛍光イメージングのためのサブミクロン級ポリマー開口アレイデバイス」、第 58 回春季応用物理学会、神奈川、3月26日(2011).
17. 佐藤秀介、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、吉田泰彦、一木隆範、「大規模 cDNA マイクロアレイチップ作製技術の開発と一括タンパク質合成の検討」、第 58 回春季応用物理学会、神奈川、3月26日(2011).
18. 森安順平、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「In vitro 転写・翻訳システムを利用したインタリオプリンティング法によるプロテインパターンニング[II]」、第 58 回春季応用物理学会、神奈川、3月26日(2011).
19. 小野堯生、飯塚怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「透明フッ素ポリマーのナノ加工による回折限界を越えた局所照明デバイスの開発」、第 72 回応用物理学会学術講演会、山形、1a-ZG-1、9月1日(2011).
20. 佐藤秀介、マニッシュビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「超大規模集積 DNA マイクロアレイチップ上での変異体 GFP ライブラリーの一括合成」、第 72 回応用物理学会学術講演会、山形、9月1日(2011).
21. 藤田孝紘、マニッシュビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「VOF 法を用いたマイクロリアクターアレイ上の水油二相流の挙動解析」、第 72 回応用物理学会学術講演会、山形、9月1日(2011).
22. 小林遼、マニッシュビヤニ、一木隆範、「マイクロインタリオプリンティング法を用いた mRNA 微細パターン形成」、第 72 回応用物理学会学術講演会、山形、9月1日(2011).
23. 田原健太郎、飯塚 怜、小野堯生、五十嵐圭日子、鮫島正浩、一木隆範、船津高志、「高機能 β -グルコシダーゼをスクリーニングするための高感度酵素活性定量法の開発」、日本薬学会物理系薬学部会 第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、ホテル箱根アカデミー、神奈川、9月12日～13日(2011).
24. R. Iizuka, T. Funatsu, “Kinetic analysis of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins”, 日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス 兵庫、9月16日～18日(2011).
25. K. Tahara, R. Iizuka, T. Ono, K. Igarashi, M. Sameshima, T. Ichiki, T. Funatsu, “Development of microchaber chip-based assay for β -glucosidase activity”, 日本生物物理学会第 49 回年会、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス 兵庫、9月16日～18日(2011).
26. S. Ueno, N. Nemoto, “In vitro selection of protease:an approach towards the evolution of an enzyme using in vitro display method” 第 49 回日本生物物理学会年会、兵庫県立大学、兵庫、9月17日(2011).
27. T. Fukushima, W. Cai, M. Suzuki, K. Nishigaki, T. Kubo, N. Nemoto, 「mRNA/cDNA ディスプレイ法を応用した迅速なタンパク質-分子相互作用解析法」 第 49 回日本生物物理学会年会、兵庫県立大学、兵庫、9月17日(2011).
28. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, “Development and Evaluation of Local Illumination Device beyond Diffraction Limit using Polymeric Nanohole Array” 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2011), Nagoya, Japan, September 28-30 (2011).
29. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki “Ultralarge-scale DNA microreactor array enabling one-step synthesis of mutant protein library on chip” 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2011), Nagoya, Japan, September 28-30 (2011).
30. 根本直人、木村真之介、熊地重文、Cai Wei yan、鈴木美穂、西垣功一、久保泰、「cDNA display 法によるジスルフィド結合を複数含むペプチドライブラリーからのアセチルコリン結合タンパク質結合ペプチドアダプターの試験管内淘汰」、第 48 回ペプチド討論会、札幌コンベンションセンター、北海道、9月29日(2011).

31. S. R. Kumal, M. Biyani, and T. Ichiki, "One-pot protein synthesis and arraying using puromycin and pure technology for on chip proteomics", ISAJ symposium, Tokyo, October 7 (2011).
32. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto and T. Ichiki, "Site-Specific Detachment and in situ Transfer of Nucleic Acids from SAM on Gold Surface to Another Glass Surface by Photoirradiation" 15th International Conference on Thin Films, Nagoya, Japan, November 8 (2011).
33. S. R. Kumal, M. Biyani, T. Ichiki, 「Protein C-terminal fluorescent labeling using Puromycin technology: can it affect protein folding?」、日本分子生物学会第 34 回年会、1P-0662、横浜、12 月 13 日 (2011).
34. M. Biyani, T. Akagi, N. Nigam, A. Kumar, T. Ichiki, 「High throughput on-chip cell analysis system to study cancer chemoprevention」、日本分子生物学会第 34 回年会、1T13pII-8(1P-0725)、横浜、12 月 13 日 (2011).
35. 佐藤秀介、マニッシュビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「高速進化分子のための超大規模 DNA マイクロアレイチップを用いた変異体タンパク質一括合成」、P-15-D、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜、12 月 20 日 (2011).
36. 小野堯生、飯塚怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「1 分子イメージングのためのポリマー製ナノホールを用いた局所照明デバイス」、P-16-D、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館(神奈川)、12 月 20 日 (2011).
37. 藤田孝紘、マニッシュビヤニ、一木隆範、「PLIC-VOF 法によるマイクロリアクターへの水溶液自動封入シミュレーション」、P-17-M、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館(神奈川)、12 月 20 日 (2011).
38. 佐藤秀介、マニッシュビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「チップ上での変異体タンパク質ライブラリー淘汰技術の開発」、16p-F1-6、第 59 回 応用物理学関係連合講演会、早稲田大学、東京、3 月 16 日 (2012).
39. 小林遼、佐藤秀介、マニッシュビヤニ、一木隆範、「無細胞転写系を用いたマイクロクロインタリオプリンティングによる「その場」mRNA 合成とパターン形成」、16p-F1-11、第 59 回 応用物理学関係連合講演会、早稲田大学、東京、3 月 16 日 (2012).
40. 田中陽子、ビヤニマニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「His タグを用いるマイクロインタリオプリンティングにおけるパターンサイズ効果」、16p-F1-12、第 59 回 応用物理学関係連合講演会、早稲田大学、東京、3 月 16 日 (2012).
41. ラジクマールスバシニ、ビヤニマニッシュ、一木隆範、「Protein Synthesis Using Puromycin Technology for On-Chip Proteomics」、16p-F1-13、第 59 回 応用物理学関係連合講演会、早稲田大学、東京、3 月 16 日 (2012).
42. 小野堯生、飯塚怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「ポリマー製ナノホールアレイデバイスを用いた光の回折限界を越えた 1 分子イメージング」、17a-F8-6、第 59 回 応用物理学関係連合講演会、早稲田大学、東京、3 月 17 日 (2012).
43. M. Biyani, S. Sato, R. Kobayashi, Y. Tanaka, T. Ichiki, "High-density Biomolecular Microarray Patterning by Self Assembly and Printing Technology", 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-29), Chiba, Japan, June 27-29 (2012).
44. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto, and T. Ichiki, "Photoassisted Recovery of DNA Molecules for On-chip directed Evolution", 29th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-29), Chiba, Japan, June 27-29, 2012.
45. 小野堯生、飯塚 怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、「ポリマーナノホールを用いた 1 分子イメージング」、第 73 回 応用物理学学会学術講演会、松山大学、9 月 12 日 (2012).
46. 小林遼、小野愛子、上野真吾、ビヤニマニッシュ、一木隆範、「固相表面での DNA 固定リンカーの熱安定性の検討」、第 73 回 応用物理学学会学術講演会、松山大学、9 月 13 日 (2012).

47. 田中陽子、ビヤニマニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「His タグを用いるマイクロインタリオプ
リンティング・モールド内分子吸着の抑制効果」、第 73 回応用物理学会学術講演会、松
山大学、9 月 13 日 (2012).
48. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, “Single-Molecule
Fluorescence Imaging using Polymeric Nanoholes beyond Diffraction Limit”, 2012
International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM 2012),
Kyoto, September 25-27 (2012).
49. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki “Artificial darwinian selection
technology on microarray chips towards directed evolution using single molecule
processing”, 16h International Conference on Miniaturized Chemical and
Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2012), Okinawa,
Japan, October 29-November 1 (2012).
50. R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Ueno, M. Biyani and T. Ichiki, “Fabrication of fine
mRNA pattern using microintaglio printing method”, Microprocess and
Nanotechnology Conference 2012, Kobe, Japan, October 30-November 2 (2012).
51. 倉持宏実、小野愛子、スバシニラジクマール、上野真吾、一木隆範、「大規模スクリーニング
チップ用アミノ基修飾基板作製条件の検討」、第 60 回応用物理学会春季学術講演会、神
奈川工科大学、厚木、神奈川、3 月 29 日 (2013).
52. 平井辰典、佐藤秀介、上野真吾、ビヤニ マニッシュ、飯塚怜、船津高志、一木隆範、
「Emulsion PCR を用いた酵素遺伝子のビーズ上固定化」、第 60 回応用物理学会春季学
術講演会、神奈川工科大学、厚木、神奈川、3 月 29 日 (2013).
53. スバシニラジクマール、マニッシュビヤニ、一木隆範、「Development of Protein
Microarray via Puromycin Technology」、第 60 回応用物理学会春季学術講演会、神奈
川工科大学、厚木、神奈川、3 月 29 日 (2013).
54. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, M. Biyani and T. Ichiki, “Fabrication and
Application of DNA-protein Conjugate Chip using Photosensitive Molecules”, 30th
International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-30),
Chiba, Japan, June 26-27 (2013).
55. 佐藤秀介、福田拓海、上野真吾、ビヤニ マニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「個々の変異
体を隔離する技術を用いたタンパク質の熱安定性評価」、16p-C6-11、同志社大学京田辺
キャンパス、京田辺、京都、9 月 16 日 (2013).
56. 福田拓海、佐藤秀介、上野真吾、マニッシュビヤニ、一木隆範、「高集積タンパク質アレイ作
製のための送液デバイスの開発」、16p-C6-12、同志社大学京田辺キャンパス、京田辺、京
都、9 月 16 日 (2013).
57. 平井辰典、佐藤秀介、上野真吾、ビヤニマニッシュ、飯塚怜、船津高志、一木隆範、「マイク
ロインタリオプリントによる糖分解酵素マイクロアレイの作製」、16p-C6-13、同志社大学京田
辺キャンパス、京田辺、京都、9 月 16 日 (2013).
58. 倉持宏実、小野愛子、上野真吾、一木隆範、「水中でのガラス基板アミノ基修飾における温
度の効果」、17a-C6-2、同志社大学京田辺キャンパス、京田辺、京都、9 月 17 日 (2013).
59. 大久保幸太朗、日向野駿、上野太郎、船津高志、山本英明、谷井孝至、「リアルタイム 1 分
子蛍光イメージング法の SN 比を向上するゼロモード導波路の設計」第 74 回応用物理学
会秋季学術講演会、同志社大学京田辺キャンパス、京田辺、京都、9 月 16 日～20 日
(2013).
60. Manish Biyani, Yoko Tanaka and Takanori Ichiki, “Development of Robot-free
High-density Protein Biochips for Global Proteomics Research”, Microprocess and
Nanotechnology Conference 2013, Sapporo, Japan, Nov. 5-8, 2013.
61. 平井辰典、佐藤秀介、上野真吾、ビヤニ・マニッシュ、飯塚怜、船津高志、一木隆範、
「In situ 合成による高密度糖分解酵素マイクロアレイの作製」、19p-E17-19、第 61
回応用物理学会春季学術講演会、青山学院大学、神奈川県、2014 年 3 月 19 日。
62. Subhashini Raj kumal, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, “Fabrication of protein

arrays using biotinylated amber codon suppressor tRNA”, 19p-E17-18, 第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 青山学院大学、神奈川県、2014 年 3 月 19 日.

② ポスター発表 (国内会議 48 件、国際会議 39 件)

1. M. Biyani, T. Osawa, N. Nemoto and T. Ichiki, “One-to-one gene-encoded functional protein microarray.” 12th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2008), San diego, USA, October 12-16 (2008).
2. T. Ono, S. Sugimoto, T. Akagi and T. Ichiki, “Deep etching and hydrophilization of transparent perfluoropolymer for biodevice fabrication.”, Int. Symp. Dry Process 2008, Tokyo, November 26 (2008).
3. R. Iizuka, T. Ueno, N. Morone, Y. Shirasaki, T. Funatsu, 「1分子蛍光偏光法による古細菌シャペロニンの構造変化解析」、第 46 階日本生物物理学会年会、福岡、12 月 3 日-5 日 (2008).
4. S. Uemura, Y. Shimizu, R. Iizuka, T. Ueno, R. Akahori, N. Shimamoto, T. Tanii, I. Ohdomari, J. Puglisi, T. Funatsu, 「ナノ開口基板上でのタンパク質翻訳中における高濃度 tRNA の1分子ダイナミクス」、第 46 階日本生物物理学会年会、福岡、12 月 3 日-5 日 (2008).
5. 鮫島知哉、飯塚怜、上野太郎、船津高志、「GroEL-GroES 相互作用に与える変性タンパク質の影響」、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、12 月 9 日-12 日 (2008).
6. T. Osawa, M. Biyani, N. Nemoto and T. Ichiki, “Influence of Cell-free Translation System on Puromycin Linker-protein Fusion.”, Int. Union of Materials Research Societies (IUMRS-ICA2008), Nagoya, December 10 (2008).
7. 小野堯生、赤木貴則、一木隆範、「非晶質フッ素ポリマーの低圧アルゴンプラズマによる表面改質」、第 56 回応用物理学関係連合講演会、筑波、3 月 31 日 (2009).
8. 鮫島知哉、飯塚怜、上野太郎、船津高志、「変性タンパク質が GroEL-GroES football 型複合体の形成を促進する」、第 82 回日本生化学会大会、神戸国際会議場・神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場、神戸、兵庫、10 月 21 日~24 日 (2009).
9. 鮫島知哉、上野太郎、和田純一、青木睦子、飯塚怜、島本直、大泊巖、谷井孝至、「Zero-mode waveguides を利用した GroEL-GroES 相互作用の1分子蛍光イメージング」、第 47 回日本生物物理学会年会、アスティとくしま、徳島、10 月 30 日~11 月 1 日 (2009).
10. M. Biyani, T. Osawa, S. Mohri and T. Ichiki, “Self-assembled molecular lithography using femtoliter microreactor array-mold” 13th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2009), Jeju, Korea, November 1-5 (2009).
11. T. Ono, T. Akagi and T. Ichiki, “Microfabrication and surface treatment technologies of amorphous perfluoropolymer films and its application to micro TAS device fabrication” 13th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2009), Jeju, Korea, November 1-5 (2009).
12. S. Mohri, T. Osawa, M. Biyani, T. Akagi, and T. Ichiki, “Large-scale RNA microarray printing using a femtoliter-scale microwell array plate as a template” Microprocess and Nanotechnology Conference 2009, Sapporo. Nov. 16-19 (2009).
13. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi, and T. Ichiki, “Fundamental study of droplets formation in emulsion for PCR”, 第 19 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、12 月 7-9 日 (2009).
14. J. Moriyasu, S. Mohri, M. Biyani, T. Akagi, T. Ichiki, “Patterned Immobilization of Protein Molecules Using His-tag and Cell-free Translation System”, 第 19 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、12 月 7-9 日 (2009).
15. S. Mohri, M. Biyani, T. Akagi, and T. Ichiki, “Development of the molecular

- patterning chip using a femtoliter-scale microreactor array chip as a template”, 第 19 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、12 月 7-9 日(2009).
16. 根本直人、山口淳一、モハメッド ナイムジン、ビヤニ マニッシュ、町田雅之、伏見譲、「cDNA display 法: mRNA display (in vitro virus) 法の改良による新機能ペプチドの創出」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日~12 日 (2009).
 17. 望月祐樹、ビヤニ マニッシュ、鈴木美穂、西垣功一、根本直人、「新規ピューロマイシン・リンカーを用いた cDNA ディスプレイ法の簡便で効率的な調整法」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日~12 日 (2009).
 18. 木村真之介、望月祐樹、鈴木美穂、西垣功一、根本直人、「cDNA/mRNA ディスプレイ (in vitro virus) 法に最適な mRNA 構造」、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日~12 日 (2009).
 19. T. Sameshima, T. Ueno, J. Wada, R. Iizuka, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Tanii, T. Funatsu, “Single-molecule imaging of 1:2 GroEL-GroES complexes in zero-mode waveguides” Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, California, USA, February 20-24 (2010).
 20. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, T. Funatsu “Denatured proteins facilitate the formation of the football-shaped GroEL-GroES complex” Meeting on Molecular Chaperones and Stress Response, New York, USA, May 4-8 (2010).
 21. R. Iizuka, T. Sameshima, T. Ueno, J. Wada, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Funatsu “Single-molecule characterization of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides” Meeting on Molecular Chaperones and Stress Response, New York, USA, May 4-8 (2010).
 22. 佐藤秀介、マニッシュ・ビヤニ、赤木貴則、吉田泰彦、一木隆範、「粒径分布を考慮した 1 分子エマルジョン PCR 条件の検討」、第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、東京、6 月 11 日 (2010).
 23. 福島貴之、小林寿珠子、鈴木美穂、西垣功一、久保泰、根本直人、「無細胞翻訳系合成タンパク質の迅速な精製技術とそのタンパク質間相互作用解析への応用」、日本蛋白質科学会、札幌、6 月 16 日 (2010).
 24. 藤田孝紘、マニッシュ ビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「高効率・定量バイオ分析のためのマイクロリアクタアレイチップの作製」、第 71 回秋季応用物理学会、長崎、9 月 15 日 (2010).
 25. T. Funatsu, “Single-molecule study on the decay process of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides” 16th International Workshop on “Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences” Berlin-Adlershof, Germany, September 15-17, (2010).
 26. T. Ueno, T. Abe, T. Sameshima, R. Iizuka, T. Funatsu “Analysis of the dissociation process of chaperonin GroEL/ES complex using a single ring mutant” The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, Japan, September 20-22 (2010).
 27. R. Iizuka, T. Funatsu “Kinetic study on the de novo chromophore formation of fluorescent proteins” The 48th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Sendai, Japan, September 20-22 (2010).
 28. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu, and T. Ichiki, “Damage-free microfabrication of transparent perfluoropolymer for single-molecule imaging device”, 14th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2010), Holland, October 3-7, (2010).
 29. J. Moriyasu, M. Biyani, T. Akagi, and T. Ichiki, “High-density protein array patterning using cell-free coupled transcription-translation system and intaglio printing method”, 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Fukuoka, November 9-12 (2010).
 30. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi, Y. Yoshida and T. Ichiki, “Self-Assembled Large-scale

- DNA Microarray Chip using Single-molecule ePCR and Microreactor Array Technology”, 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Fukuoka, November 9-12 (2010).
31. J. Wada, S. Ryu, Y. Asano, T. Funatsu, T. Yukawa, J. Mizuno, T. Tanii “Fabrication of zero-mode waveguide by ultraviolet nanoimprint lithography lift-off process” 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Fukuoka, Japan, November 9-12 (2010).
 32. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi, Y. Yoshida and T. Ichiki, “Fabrication of large-scale cDNA microarray chips using magnetic beads for DNA carrier.”、第 20 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、December 21 (2010).
 33. T. Fujita, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki, “Fabrication of microreactor array chips with hydrophobic/hydrophilic patterned surface for high-throughput liquid sample handling.”、第 20 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、December 21 (2010).
 34. J. Moriyasu, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki, “Patterning of protein microarray using cell-free co-synthesis system and microintaglio printing method.”、第 20 回日本 MRS 学会シンポジウム、横浜、December 21 (2010).
 35. R. Iizuka, M. Yamagishi-Shirasaki, T. Funatsu “Kinetic study of denovo chromophore maturation of fluorescent proteins” Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, March 5-9 (2011).
 36. 佐藤秀介、マニッシュビヤニ、赤木貴則、一木隆範、「高速分子進化システム開発のための大規模 cDNA マイクロアレイチップの作製」、第 11 回東京大学生命科学シンポジウム、東京、6 月 4 日 (2011).
 37. 飯塚怜、船津高志、「新生蛍光タンパク質の発色団形成反応の速度論的解析」、第 11 回東京大学生命科学シンポジウム、東京、6 月 4 日 (2011).
 38. M. Biyani, R. Kobayashi, S. Sato and T. Ichiki, "Molecular screening on a chip by DNA-displayed protein microarray" 15th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2011), Seattle, U.S.A., October 2-6 (2011).
 39. T. Ono, R. Iizuka, T. Akagi, T. Funatsu and T. Ichiki, "Nanofabrication of polymeric aperture array for localized illumination beyond diffraction limit" 15th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2011), Seattle, U.S.A., October 2-6 (2011).
 40. S. Sato, M. Biyani, T. Akagi and T. Ichiki, "On-chip synthesis of mutant GFP library using ultra-large self-aligned DNA-bound beads microarray" 15th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2011), Seattle, U.S.A., October 2-6 (2011).
 41. R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, S. Ueno, M. Biyani and T. Ichiki, “Microintaglio printing of mRNA via hybridization with DNA self-assembled monolayers on gold surfaces” 15th International Conference on Thin Films (ICTF-15), Kyoto, Japan, November 8-11 (2011).
 42. T. Ichiki, S. Sato, M. Biyani, and T. Akagi, “Integration technology of mutant DNA and protein libraries on a chip”, 15th International Conference on Thin Films (ICTF-15), Kyoto, Japan, November 8-11, (2011).
 43. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto and T. Ichiki, “Site-specific detachment and in situ transfer of nucleic acids from SAM on gold surface to another glass surface by photo-irradiation”, 15th International Conference on Thin Films (ICTF-15), Kyoto, Japan, November 8-11 (2011).
 44. T. Fujita, M. Biyani, and T. Ichiki, “PLIC-VOF simulation of flow-assisted auto-dispensing of aqueous liquid into a microreactor array”, 15th Int. Conf. Thin Films, Kyoto, Japan, November 9 (2011).
 45. S. Sato, “One-step synthesis of mutant protein library on DNA microarray for combinatorial bioengineering”, Seoul Nanohealth Symposium 2011, November

- 17-18 (2011).
46. S. Kobayashi, M. Suzuki, K. Nishigaki, N. Nemoto, “An exploration of liposome membrane-binding peptides by cDNA display” 第 34 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2011), パシフィコ横浜、横浜、12 月 13 日 (2011).
 47. S. Ueno, N. Nemoto, “Improvement of a puromycin-linker for cDNA display towards realizing universal in vitro selection applications” 第 34 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2011), パシフィコ横浜、横浜、12 月 13 日 (2011).
 48. 谷垣 保幸、飯塚 怜、櫻井 貴志、関根 瑠威、Dong Hyun Yoon、鈴木 美穂、西垣 功一、庄子 習一、船津 高志、根本 直人、「マイクロ流路デバイスを用いて作製した油中水滴型エマルジョン内でのタンパク質合成」 日本分子生物学会第 34 回年会、パシフィコ横浜、横浜、12 月 13 日 (2011).
 49. 小林遼、田中陽子、佐藤秀介、上野真吾、マニッシュビヤニ、一木隆範、「mRNA 微細パターンニングのためのマイクロインタリオプリンティング法」、P-P02-M、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜、12 月 19 日 (2011).
 50. 田中陽子、ビヤニマニッシュ、赤木貴則、一木隆範、「マイクロインタリオプリンティング法を用いた GFP 固定化の基礎的研究」、P-P33-M、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜、12 月 19 日 (2011).
 51. S. R. Kumal, M. Biyani, and T. Ichiki, 「Protein C-terminal fluorescent labeling using Puromycin technology: can it affect protein folding?」P-P05-M、第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム、横浜市開港記念会館、横浜、12 月 19 日 (2011).
 52. K. Tahara, R. Iizuka, T. Ono, K. Igarashi, M. Samejima, T. Ichiki, T. Funatsu “Development of microchamber array chip-based assay system for β -glucosidase activity”, Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, California, USA, February 25-29, 2012
 53. 小野堯生、飯塚怜、赤木貴則、船津高志、一木隆範、“ポリマー製ナノホールアレイデバイスと 1 分子イメージングへの応用” 第 12 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、東京、6 月 30 日 (2012).
 54. 佐藤秀介、ビヤニマニッシュ、赤木貴則、一木隆範、“マイクロアレイチップを用いた変異体タンパク質の人工淘汰”、第 12 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、東京、6 月 30 日 (2012).
 55. S. Kumachi, M. Suzuki, K. Nishigaki, Y. Husimi and N. Nemoto, “Generation of Functional Peptides Consisting of Four Types of Amino Acids by a cDNA Display Method.” The 26th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, USA, August 4-8 (2012).
 56. N. Nemoto and S. Ueno, “In Vitro Evolution of an Enzyme by cDNA Display Method.” The 26th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, USA, August 4-8 (2012).
 57. S. Ueno, Y. Mashio, T. Ichiki, N. Nemoto, “In vitro selection of a protease using cDNA display”, 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 22 日～24 日 (2012).
 58. S. Kumachi, M. Suzuki, K. Nishigaki, Y. Husimi, N. Nemoto, “Generation of Functional Peptides Consisting of 4 Types of Amino Acids by cDNA Display Method”、第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 22 日～24 日 (2012).
 59. K. Tahara, R. Iizuka, T. Ono, K. Igarashi, M. Samejima, T. Ichiki, T. Funatsu, “Monitoring the single-molecule enzymatic activity of β -glucosidase in a microchamber array chip”、第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 22 日～24 日 (2012).
 60. Y. Takei, R. Iizuka, T. Ueno, T. Funatsu, “Direct observation of protein folding mediated by the football-shaped GroEL-GroES complex”, 第 50 回日本生物物理学会年会、名古屋、9 月 22 日～24 日 (2012).
 61. S. Ueno, A. Ono, R. Kobayashi, Y. Tanaka, S. Sato, M. Biyani, N. Nemoto, T. Ichiki

- “Spot-selective DNA recovery from DNA microarray chips for on-chip directed evolution” 16th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, Okinawa, Japan, October 28 – November 1 (2012).
62. Y. Tanaka, M. Biyani, T. Akagi, T. Ichiki “High-throughput protein microarrays: feature size effects on printing arrays with in situ protein synthesis” 16th International Conference on Miniaturized System for Chemistry and Life Sciences, Okinawa, Japan, October 28 – November 1 (2012).
 63. S. R. Kumal, M. Biyani, and T. Ichiki, “Development of Production Method of Protein Microarray Chips via Puromycin Technology”, Microprocess and Nanotechnology Conference 2012, Kobe, Japan, October 30-November 2 (2012).
 64. S. Ryu, S. Higano, K. Ohkubo, Y. Asano, A. Inoue, T. Ueno, T. Funatsu, T. Tanii “Interaction kinetics of proteins confined within a nanocavity evaluated by real-time single-molecule fluorescence imaging”, 25th International Microprocess and Nanotechnology Conference, Kobe Meriken Park Oriental Hotel, Kobe, Japan, October 30-November 2 (2012).
 65. Y. Mashio, S. Ueno, T. Ichiki, N. Nemoto, “In vitro Selection System of a Protease Using cDNA Display”, 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡、12 月 11 日～14 日 (2012).
 66. Y. Yoshikawa, R. Iizuka, M. Suzuki, K. Nishigaki, T. Funatsu, N. Nemoto, “In vitro Selection of a Novel Ribosome Display with a DNA Linker at Room Temperature”, 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日～14 日 (2012).
 67. R. Iizuka, I. Toshimitsu, K. Tahara, H. Arai, T. Tetsuka, K. Matsuoka, S. Ryu, Y. Asano, T. Tanii, K. Igarashi, M. Sameshima, T. Funatsu, “Probing single-molecule enzymatic dynamics of β -glucosidase using zero-mode waveguides”, Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA, February 2-6 (2013).
 68. 小林遼、小野愛子、倉持宏実、上野真吾、ビヤニマニッシュ、一木隆範、「ハイブリダイゼーションを精密制御した mRNA のマイクロインタリオプレンティング」、第 60 回応用物理学会春季学術講演会、神奈川工科大学、厚木、神奈川、3 月 29 日 (2013).
 69. Y. Takei, R. Iizuka, T. Ueno, T. Sameshima, T. Funatsu “Single-molecule observation of protein folding in chaperonin GroEL-(GroES)₂ complexes” 8th Asian Biophysics Association Symposium, Jeju, Korea, May 26-29 (2013).
 70. ラジクマールスバシニ、ビヤニマニッシュ、上野真吾、一木隆範、「Study on Protein Array Fabrication from cDNA via Puromycin Based C-Terminal Labeling of Proteins (ピュロマイシンによる C 末端ラベル化を用いた cDNA からのプロテインアレイ作製法の研究)」、第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、東京、6 月 8 日 (2013).
 71. 上野真吾、小林遼、佐藤秀介、小野愛子、ビヤニマニッシュ、一木隆範、「cDNA display microarray for high-throughput on-chip protein screening. (タンパク質のハイスループット解析を目的とした cDNA ディスプレイマイクロアレイ)」、第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、東京、6 月 8 日 (2013).
 72. 佐藤秀介、福田拓海、上野真吾、一木隆範、「Fabrication of on-chip protein synthesis interface fluidic device for artificial Darwinian selection. (人工淘汰のための機能性タンパク質のチップ上合成インターフェース送流デバイスの作製)」、第 13 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、東京、6 月 8 日 (2013).
 73. S. Kumachi, M. Suzuki, K. Nishigaki, N. Nemoto. “Analysis of Molecular Interactions by Both Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and Rapid Fluorescence Labeling of Proteins in a Cell-free Translation System” The 27th Annual Symposium of The Protein Society (Boston, USA), July 20–23 (2013).
 74. S. Ueno, S. Sato, T. Hirai, T. Fukuda, H. Kuramochi, M. Biyani, T. Ichiki, ” Directed evolution of proteins using a novel microarray device” RSC Tokyo International Conference, A104, Chiba, Japan, September 5 (2013).

75. Shusuke Sato, Takumi Fukuda, Tatsunori Hirai, Shingo Ueno, Manish Biyani, Takanori Akagi and Takanori Ichiki, "Fabrication of planar microfluidic device for artificial darwinian selection technology", 17th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2013), Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013.
76. Shingo Ueno, Ryo Kobayashi, Manish Biyani and Takanori Ichiki, "Protein-DNA conjugate array chip for on-chip directed evolution", 17th International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2013), Freiburg, Germany, Oct. 27-31, 2013.
77. Tatsunori Hirai, Shusuke Sato, Shingo Ueno, Manish Biyani, Rei Iizuka, Takashi Funatsu and Takanori Ichiki, "Fabrication of beta-glucosidase Microarray by in Situ Protein Synthesis and Immobilization", Microprocess and Nanotechnology Conference 2013, Sapporo, Japan, Nov. 5-8, 2013.
78. Takumi Fukuda, Shusuke Sato, Shingo Ueno Manish Biyani and Takanori Ichiki, "Rapid Compartmentalization of Microwell Arrays using a Microfluidic Device", Microprocess and Nanotechnology Conference 2013, Sapporo, Japan, Nov. 5-8, 2013.
79. Hiromi Kuramochi, Shingo Ueno, Takumi Fukuda, Subhashini Raj Kumal, Aiko Ono and Takanori Ichiki, "Creating Uniform Amino-terminated Layer on Glass Surface using Water as Solvent", Microprocess and Nanotechnology Conference 2013, Sapporo, Japan, Nov. 5-8, 2013.
80. 上野真吾、小林遼、マニッシュ・ビヤニ、一木隆範、「光操作を利用した cDNA display アレイ技術」、3P-0967、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸コンベンションセンター、兵庫県、2013 年 12 月 5 日。
81. Subhashini Raj Kumal, Shingo Ueno, Takanori Ichiki, "Protein labeling using biotinylated amber codon suppressor tRNA for fabrication of high density protein arrays", 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸コンベンションセンター、兵庫県、2013 年 12 月 5 日。
82. 福田拓海、佐藤秀介、上野真吾、マニッシュ・ビヤニ、一木隆範、"Micro-Compartmentalization of Large-Scale-Integrated Microwells Using a Fluidic Device", N-P10-010、日本 MRS 年次大会、横浜情報文化センター、神奈川県、2013 年 12 月 10 日。
83. 平井辰典、佐藤秀介、上野真吾、マニッシュ・ビヤニ、飯塚怜、船津高志、一木隆範、"High-Density Enzyme Microarray by in Situ Protein Synthesis and Immobilization", N-P10-020、日本 MRS 年次大会、横浜情報文化センター、神奈川県、2013 年 12 月 10 日。
84. 上野真吾、小林遼、ビヤニ・マニッシュ、一木隆範、「タンパク質の定向進化を目的とした mRNA-タンパク質共固定化アレイチップ」、N-P10-021、日本 MRS 年次大会、横浜情報文化センター、神奈川県、2013 年 12 月 10 日。
85. 倉持宏実、小野愛子、上野真吾、一木隆範、「水溶媒を用いたガラス基板アミノ基修飾法」、O-P10-004、日本 MRS 年次大会、横浜情報文化センター、神奈川県、2013 年 12 月 10 日。
86. 福田拓海、佐藤秀介、上野真吾、マニッシュ・ビヤニ、一木隆範、「送液デバイスによる高集積マイクロウェルアレイのコンパートメント化」、バイオエレクトロニクス・バイオテクノロジー研究討論会、東京農工大、東京都、2013 年 12 月 16 日。
87. 上野真吾、小林遼、マニッシュ・ビヤニ、一木隆範、「機能性タンパク質の高効率スクリーニングを目的とした光操作可能な生体高分子アレイチップ」、バイオエレクトロニクス・バイオテクノロジー研究討論会、東京農工大、東京都、2013 年 12 月 16 日。

(4)知財出願

国内出願 (14 件)

(5)受賞・報道等

① 受賞

1. 賞名:第 20 回日本 MRS 学術シンポジウム講演奨励賞
受賞日:2011 年 1 月 20 日
受賞内容:1 分子イメージングデバイスのための透明フッ素ポリマーのナノマイクロ加工
受賞者:小野堯生
2. 賞名:Award for Encouragement of Research in Thin Films, 15th International Conference on Thin Films 2011
受賞日:2011 年 11 月 11 日
受賞内容:Microintaglio printing of mRNA via hybridization with DNA self-assembled monolayers on gold surfaces
受賞者:Ryo Kobayash
3. 賞名:第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞
受賞日:2011 年 12 月 19 日
受賞内容:高速進化分子のための超大規模 DNA マイクロアレイチップを用いた変異体タンパク質一括合成
受賞者:佐藤 秀介
4. 賞名:第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞
受賞日:2011 年 12 月 19 日
受賞内容:1 分子イメージングのためのポリマー製ナノホールを用いた局所照明デバイス
受賞者:小野 堯生
5. 賞名:第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞
受賞日:2011 年 12 月 19 日
受賞内容:PLIC-VOF 法によるマイクロリアクターへの水溶液自動封入シミュレーション
受賞者:藤田 孝紘
6. 賞名:第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞
受賞日:2011 年 12 月 19 日
受賞内容:マイクロインタリオプリンティング法による mRNA の微細パターンニング
受賞者:小林 遼
7. 賞名:東京大学生命科学シンポジウム ポスター賞
受賞日:2012 年 6 月 30 日
受賞内容:マイクロアレイチップを用いた変異体タンパク質の人工進化
受賞者:佐藤秀介
8. 賞名:東京大学生命科学シンポジウム ポスター賞
受賞日:2012 年 6 月 30 日
受賞内容:ポリマー製ナノホールアレイデバイスと 1 分子イメージングへの応用
受賞者:小野堯生
9. 賞名:応用物理学会講演奨励賞
受賞日:2012 年 9 月 12 日

受賞内容:ポリマー製ナノホールアレイデバイスを用いた光の回折限界を越えた 1 分子イメージング

受賞者:小野堯生

10. 賞名:東京大学工学系研究科長賞

2013年3月25日

受賞者:小林遼

11. *賞名:応用物理学会 ポスター賞

受賞日:2013年3月29日

受賞内容:ハイブリダイゼーションを精密制御した mRNA のマイクロインタリオプリンティング

受賞者:小林遼, 倉持宏実, 一木隆範

12. 賞名:第13回東京大学生命科学シンポジウムポスター賞

受賞日:2013年6月8日

受賞内容:タンパク質のハイスループット解析を目的とした cDNA ディスプレイマイクロアレイ

受賞者:上野真吾

13. *賞名:Journal of Photopolymer Science and Technology, Best Paper Award 2013

受賞日:2013年6月27日

受賞内容:Photoassisted recovery of DNA molecules for on-chip directed evolution

受賞者:Shingo Ueno, Aiko Ono, Ryo Kobayashi, Yoko Tanaka, Shusuke Sato, Manish Biyani, Naoto Nemoto, and Takanori Ichiki

② マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日経産業新聞、進化分子工学の研究進む—人工的に遺伝子淘汰、2012年10月12日

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・本成果として出てきた発明のうち10件について、民間企業に独占的実施許諾、さらに近日中に1件の独占的実施許諾契約を締結予定(一木グループ)。
- ・平成25年度戦略的基盤技術高度化支援事業(サポイン事業)に採択され、現在、実施中。課題名「新規バイオ医薬(医薬候補ペプチド)探索・発見技術の高度化」(根本グループ)
- ・セミナー「ペプチドアダプター研究会」などで、研究者に対し本研究で開発した cDNA display 法について紹介した(根本グループ)。

②社会還元的な展開活動

- ・本グループの研究成果は、ITC や医療をはじめ広い分野の公開講座や研究会において情報発信された。
- ・オープンキャンパス、ラボ見学会などにより、学部学生や高校生向けにナノバイオの先端研究を紹介し、ナノテクノロジーの啓蒙、教育を行った。

§ 6 研究期間中の活動

6. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2009年8月17日	JST SPP(サイエンスパートナーシッププロジェクト)	さいたま市浦和市立中等高等学校	50名	中学生・高校生を対象にCRESTの成果を含む最先端バイオナノテクノロジーについて紹介した。
2009年7月14日	高校出前講義	東京都立東大和南高等学校	36名	高校生を対象にしてCRESTの成果を含むバイオナノテクノロジーについて紹介した。
2010年2月19日	ナノ ICT シンポジウム 2010	東京ビッグサイト	100人	「～ナノとバイオの融合が切り開く未来型 ICT～」をテーマにしたシンポジウムにて、「ナノ・マイクロ製造技術のバイオデバイス応用」についての招待講演を行った。
2010年7月21日	熊本県真和高等学校の生徒への出張講義	熊本県私立真和高等学校	100人	熊本県真和高等学校の生徒にナノテクノロジーを利用するバイオデバイス技術についての講義を行った。
2010年7月22日	熊本県文徳高等学校の生徒への出張講義	熊本県私立文徳高等学校	100人	熊本県文徳高等学校の生徒にナノテクノロジーを利用するバイオデバイス技術についての講義を行った。
2010年12月2日	高校出前講義	神奈川県立大磯高等学校	30名	高校生を対象にしてCRESTの成果を含むバイオナノテクノロジーの紹介を行った。
2011年1月24日	応用物理学会 Si テクノロジー分科会第130回研究会	東京大学	40人	「バイオ・医療診断デバイスの最前線」をテーマにした研究会を企画・開催し、ナノ製造技術のバイオ応用について議論した。
2011年7月7日	高校出前講義	茨城県立日立北高校	64名	高校生に対してCREST研究の成果を含むバイオナノテクノロジーについての講義を行った。
2011年8月31日	日本バイオイメージング学会公開講座	千歳市民文化センター	260人	高校生、大学生、社会人を対象に、1分子イメージングに関する講演を行った。

2012年6月 27-28日	第29回フォトポリマーカンファレンス	千葉大学	200人	「Nanobiotechnology」および「panel session」を企画・開催し、世界トップクラスの研究者を招待してナノバイオテクノロジーに関する研究成果を発表した。
2012年9月 11日	第73回応用物理学会 学術講演会シンポジウム	松山大学	80人	「ナノバイオセンシングの新たな挑戦」をテーマにしたシンポジウムにて招待講演を行った。
2012年10 月18日	高校出前講義	栃木県立矢板東高等学校	60名	高校生を対象にして、CRESTの研究成果を含む最先端バイオナノテクノロジーの紹介を行った。
2013年3月 15日	応用物理学会 Si テクノロジー分科会第159回研究会	東京大学	50人	MicroTAS2012 国際学会で発表された各国の最先端ナノバイオデバイス技術についての研究会を企画・開催した。
2013年6月 15日	高校出前講義	栃木県私立 國學院大學 栃木高等学校	33名	國學院大學栃木高等学校の生徒にCREST研究の成果を含むバイオナノテクノロジーについて紹介した。
2013年8月 8日	東京大学オープンキャンパス2013	東京大学	180人	高校生を対象にしたオープンキャンパスにて、スマートヘルスケア時代に向けたナノバイオデバイスに関する講義を行った。
2013年9月 14日	日本バイオイメージング学会公開講座	東京大学	160人	高校生、大学生、社会人を対象に、バイオイメージングに関する講演会を企画・開催した。

§ 7 最後に

研究の目標等から見た達成度

本プロジェクトでは、従来の進化分子工学が不得手としてきた酵素分子を進化させることさえも可能な世界初のシステムの実現を目指し、高集積マイクロアレイを中核とする新たな高速分子進化技術の構築を進めてきた。複数の新規技術を整合性を持って開発することが求められたが、世界に類を見ない技術であるがゆえに、多くの製造装置、評価装置を一から作り出すことも度々となる困難さに直面した。結果として、変異体ライブラリーの大規模集積化から、cDNA ディスプレイのマイクロアレイ化技術、高効率スクリーニングシステムの開発まで基盤要素技術をほぼ全て開発できたことは、当初の目標を達成できつつあると言える。今後、試作したシステムを運用して有用生体分子の取得を達成することで、開発したシステムの革新性を明確に示す所存である。

得られた成果の意義等の自己評価

まず、大局的には生物特有の複雑さへの対応と同時に、微細・精密が求められる本プロジェクトの技術開発は、バイオと半導体精密技術の融合がなければ到底不可能であり、まさにナノバイオテクノロジーのオリジナルの成果であると自負している。酵素分子進化システムの実現は学術的にも産業応用的にも大きいインパクトをもつが、マイクロインタリオプリント法を軸とするチップ上でのセントラルドグマの再構築技術や高速顕微イメージャーのように、各要素技術のレベルでも、機能プロテオミクスなどの生命科学研究に様々な形で貢献できると期待している。

今後の研究の展開

本プロジェクトで我々が提唱し、開発した新しい分子進化技術は汎用性が高く、酵素、抗体、アプタマー等多くの有用タンパク質、ペプチドの進化に適用可能である。企業との共同研究を展開し、実用化に向けて、成功事例の積み上げとともに、要素技術、装置システムの機能向上を目指していく予定である。変異体ライブラリーの機能分布の全貌を俯瞰しながら、淘汰サイクルを進めることのできる分子進化システムはこれまで未踏の技術であり、情報工学との連携を図ることなどにより、進化分子工学にさらに新たな進展をもたらす可能性に期待している。

研究代表者としてのプロジェクト運営について

プロジェクトが目指す達成目標を明確に提示すること、ならびに、毎月の定例ミーティングによりグループ間の情報共有、進捗状況の把握、課題の議論を密に行うことにより、チームが一体感を持ってプロジェクトを進めることができた。研究費は年度毎に研究代表者が裁量し、必要に応じて柔軟にメリハリをもって配分し、有効に研究開発に資することができたと考えている。また、多くの学生、若手の研究員が熱意をもって参画し、学会等で多くの表彰を受けることができたことも本プロジェクトの重要な成果であったと考える。