

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 Thermo-stability assay of proteins using isolation technology of each mutant

東大院工¹, JST-CREST²

◦佐藤秀介¹, 福田拓海¹, 上野真吾^{1,2}, マニッシュユ・ビヤニ^{1,2}, 赤木貴則^{1,2}, 一木隆範^{1,2}

Sch. of Eng. Univ. of Tokyo¹, JST-CREST²

◦S. Sato¹, T. Fukuda¹, S. Ueno^{1,2}, M. Biyani^{1,2}, T. Akagi^{1,2}, and T. Ichiki^{1,2}

E-mail: shusuke@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】有用タンパク質を創出する新手法の構築を目指している。有効的な手法の 1 つとして提案する大規模な変異体ライブラリーのマイクロアレイチップ化技術と進化分子工学のアプローチを融合した機能性タンパク質の高速人工分子進化システムの開発を行っている。本研究では、マイクロアレイチップ上の変異体ライブラリーから 1 種類毎の変異体の機能を評価するために不可欠な技術となる個々のマイクロウェルの隔離を送流デバイスとするタンパク質を合成するためのインターフェースを用いて容易にマイクロアレイチップ上でタンパク質を合成することが可能になった。今回、開発した隔離技術を用いて GFP(緑色蛍光タンパク質)の熱安定性の評価のモデル実験を行った。

【実験・結果】最初に、磁気ビーズ(直径 2.8 μm)の表面上に GFP をコードした DNA を固定した。続いて、DNA 固定ビーズを PDMS で形成した個々のマイクロウェル(直径 4.0 μm , 高さ 4.0 μm)に配列し、DNA マイクロアレイチップ (6.5×10^5 beads/cm², ビーズ充填率 99.7 %)を作製した。次に、GFP 合成のための送液チャンネルを平面なポリマー板上に形成した送流デバイスに DNA マイクロアレイチップを設置した。まず、4°C の環境下でリン脂質 50 μl 、無細胞合成液 50 μl 、シリコンオイル (粘度 1000 cSt) 500 μl の順で送液を行い、個々のウェルをオイルで隔離した。30°C、120 min 保持したことで、GFP をマイクロウェル内で合成した。次に 30°C から温度を上昇させることで、GFP の熱安定性を蛍光輝度の変化を評価した (蛍光顕微鏡, Ex: 488 nm)。GFP は 70°C に達した温度環境下で蛍光を失った (Fig.1-(a)(b))。作製した送流デバイスを用いて、チップ上でタンパク質の合成、並びに高温下でのタンパク質の熱安定性を評価することができた。

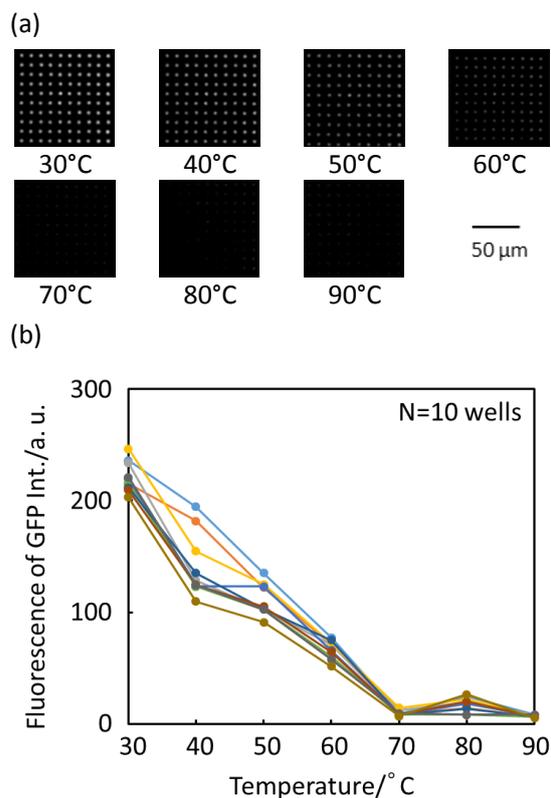


Fig.1 Demonstration of evaluation of thermo-stability of GFP. (a) Microscopic image of GFP intensity in microwell at each temperature. (b) GFP thermo-stability assay.