

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

Fabrication of β -glucosidase array by microintaglio printing東大院工¹, JST-CREST², 東大院薬³○平井辰典¹, 佐藤秀介¹, 上野真吾^{1,2}, マニッシュビヤニ^{1,2}, 飯塚怜^{2,3}, 船津高志^{2,3}, 一木隆範^{1,2}Sch. Eng. Univ. of Tokyo¹, JST-CREST², Sch. Pharm. Univ. of Tokyo³,○T. Hirai¹, S. Sato¹, S. Ueno^{1,2}, M. Biyani^{1,2}, R. Iizuka^{2,3}, T. Funatsu^{2,3}, and T. Ichiki^{1,2}

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

【緒言】バイオエタノールの製造では、原料のセルロースをセロビオース (二糖)、グルコース (単糖) と分解した後、アルコール発酵によりエタノールを得る。このうち、セロビオースからグルコースへの分解反応が遅く、全工程を律速している。この反応速度はオリゴ糖分解酵素 β -グルコシダーゼ(BGL)により決まるため、より優れた活性を有する変異体の創出が求められている。酵素の機能向上には変異体ライブラリーの高効率スクリーニングが必要であり、複数のタンパク質を 1 チップ上に集積したタンパク質マイクロアレイの利用が検討されている。このような背景の下、本研究ではマイクロインタリオプリンティング法による高密度集積酵素マイクロアレイ作製を検討した。本法は DNA マイクロアレイ上でタンパク質の合成と固定化を同時に行うものである[1]。今回、BGL のアレイ状固定化と、その基板上での酵素活性の確認に成功したので報告する。

【実験および結果】深さ 50 μm 、直径 90 μm の凹構造を有する Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) (東レ・ダウコーニング) のモールド (印刷版) を作製し、O₂ プラズマを用いて表面を親水化した。PDMS モールドに His タグ付き BGL の DNA と無細胞転写・翻訳システム (TNT® Coupled Wheatgerm Extract System, Promega)、タンパク質蛍光標識試薬 (FluoroTect, Promega) を滴下し、ニッケルニトリロ 3 酢酸 (Ni-NTA) を修飾したガラス基板上に押し付けた。30°C で 2 時間保持し、His タグを介して発現した BGL を Ni-NTA ガラス基板上へ固定した後、0.1 % (v/v) の TWEEN 20 を含むリン酸緩衝液で 5 分間洗浄した。洗浄後に共焦点顕微鏡を用いて観察し、蛍光パターンから基板上への BGL 固定化を確認した (Fig.1)。また、BGL を固定化した基板上に、酵素反応により蛍光を呈する基質を滴下し、30°C で保持して酵素活性を測定した (Fig.2)。この結果より、固定化された BGL が評価可能な酵素活性を有していることを確認した。

[1] 13a-H4-6 田中陽子他 第 73 回応用物理学会学術講演会

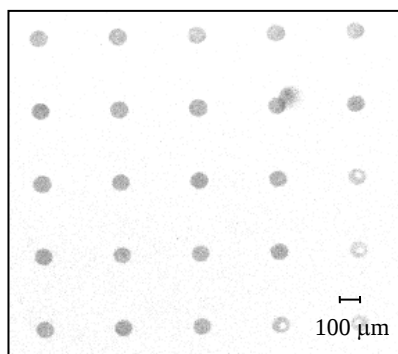


Fig.1 Fluorescence microscopy image of printed BGL pattern (Ex/Em : 488/515BP30 nm)

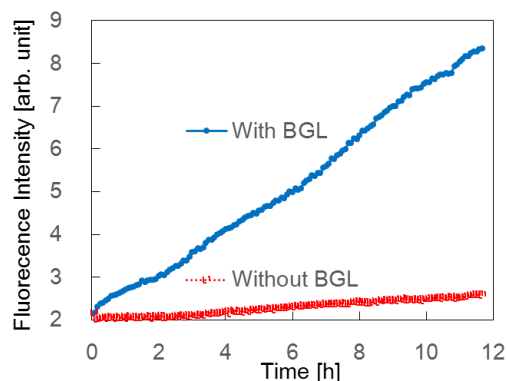


Fig.2 Enzymatic activity of immobilized BGL (Ex/Em : 561/590BP40 nm)