

新しい動的フェムトリアクタ技術によるオンチップ分析・無細胞システムの構築

(¹東大院工・応用化学) ○野地 博行¹

Dynamic femtoliter reactor technology for on-chip bioanalysis and artificial cell reconstitution

(¹*Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Tokyo*) Hiroyuki Noji¹

We have developed various single-molecule digital bioanalytical methods based on femtolitre-sized reactor array technology. Currently, we are working on the development of multi-conditional digital bioanalysis methods to elucidate the "individuality" of biomolecules and virus particles, and the development of dynamic reactor that is able to autonomously enrich or eject substances. In this presentation, I introduce the progress of this research and discuss the perspectives of this technology.

Keywords : *Dynamic femtoreactor technology, Digital bioassay, Artificial cell reactor*

我々は、体積フェムトリットル単位の溶液リアクタが並んだアレイ技術を用いて、様々な種類の超高感度バイオ分子検出技術を開発してきた。例えば、1分子酵素アッセイ技術¹・1分子感度の抗原抗体反応検出技術(デジタル ELISA)²・1分子膜輸送体計測³・1粒子感度のインフルエンザウイルス検出⁴・1分子酵素マルチプレックスプロファイリング技術⁵などがあげられる。また、1分子酵素活性の定量計測から、分子モーターの反応効率測定⁶・分子活性個性の発生分子機構解明⁷・分子個性と進化能の相関など生体分子の分子機構・進化機構の解明にも成功してきた。

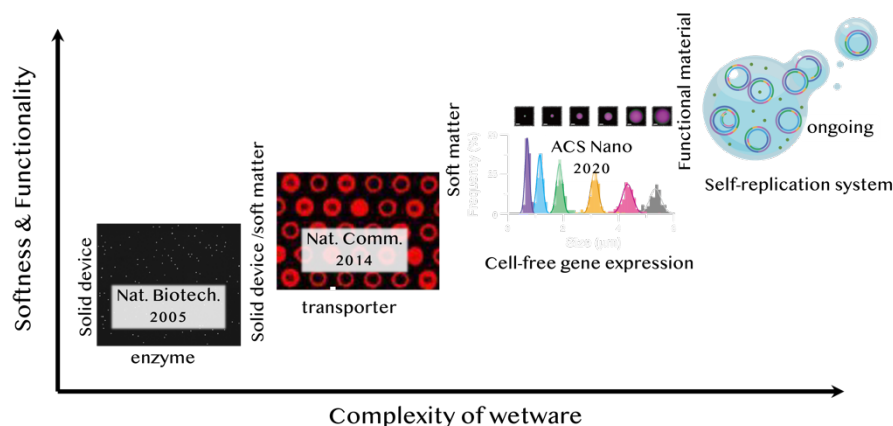
しかし、本技術をさらに発展させるためには、フェムトリアクタ技術の根本的な革新が必要である。これまでのフェムトリアクタは、試料溶液中のターゲット分子・粒子をその濃度に応じて受動的に補足するだけである。そのため、例えばデジタル ELISA においてはデバイス導入前に試料洗浄や濃縮プロセスが必須であり、全体の反応プロセスを通したシステムのマイクロ化には至っていない。また、1分子酵素解析においては、一度導入した溶液組成を変えることができないため、特定の反応条件のみでの計測にとどまっており、多条件計測による詳細解析は不可能であった。

そこで、我々はフェムトリアクタ技術の革新のためにリアクタのシリアル溶液交換技術・リアクタに分子濃縮/排除機能など、動的性質を有するフェムトリアクタ技術の確立を目指している。これまでに、20 回以上安定に溶液交換を可能とする技術を確認しインフルエンザウイルス粒子の薬剤耐性に関する「個性」の定量計測⁸に成功した。また、積極的な生体分子の濃縮技術の確立にも成功しつつある。

さらに、我々はこの動的フェムトリアクタ技術の一つの大きな到達地点は物質合成・情報変換能に加え自己成長・分裂能を有する「自律的な人工細胞リアクタ」であると考えている。これまで、無細胞遺伝子発現システムを再構成したリアクタ技術を用いた高精度の酵素スクリーニング技術の開発⁹や、均一系リボソーム中における遺伝子発現¹⁰などに成功している。このような人工細胞

胞技術を、上述の動的フェムトリアクタ技術と効果的に統合することができれば、自律的に外部情報を処理して信号を発する全く新しい分子検出技術や超並列型の分子プロタイピングが可能になるだろう。さらに、自己増幅能を備えることが可能となれば、「自律進化する人工細胞リアクタ」技術が確立するため、革新的な生体分子技術につながるものと期待される。

本発表では、動的フェムトリアクタ技術および人工細胞リアクタ技術の進捗を紹介しながら、その先に目指す構想について議論したい。



- [1] Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K. V., Arata, H., Fujita, H., Takeuchi, S., and Noji, H. (2005) Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology, *Nat Biotechnol* 23, 361-365.
- [2] Kim, S. H., Iwai, S., Araki, S., Sakakihara, S., Iino, R., and Noji, H. (2012) Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules, *Lab Chip* 12, 4986-4991.
- [3] Watanabe, R., Soga, N., Fujita, D., Tabata, K. V., Yamauchi, L., Hyeon Kim, S., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., Suga, H., and Noji, H. (2014) Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity, *Nat Commun* 5, 4519.
- [4] Tabata, K. V., Minagawa, Y., Kawaguchi, Y., Ono, M., Moriizumi, Y., Yamayoshi, S., Fujioka, Y., Ohba, Y., Kawaoka, Y., and Noji, H. (2019) Antibody-free digital influenza virus counting based on neuraminidase activity, *Sci Rep* 9, 1067.
- [5] Sakamoto, S., Komatsu, T., Watanabe, R., Zhang, Y., Inoue, T., Kawaguchi, M., Nakagawa, H., Ueno, T., Okusaka, T., Honda, K., Noji, H., and Urano, Y. (2020) Multiplexed single-molecule enzyme activity analysis for counting disease-related proteins in biological samples, *Sci Adv* 6, eaay0888.
- [6] Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., and Noji, H. (2005) Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules, *Nature* 433, 773-777.
- [7] Ueno, H., Kato, M., Minagawa, Y., Hirose, Y., and Noji, H. (2021) Elucidation and control of low and high active populations of alkaline phosphatase molecules for quantitative digital bioassay, *Protein Sci* 30, 1628-1639.
- [8] Honda, S., Minagawa, Y., Noji, H., and Tabata, K. V. (2021) Multidimensional Digital Bioassay Platform Based on an Air-Sealed Femtoliter Reactor Array Device, *Anal Chem* 93, 5494-5502.
- [9] Zhang, Y., Minagawa, Y., Kizoe, H., Miyazaki, K., Iino, R., Ueno, H., Tabata, K. V., Shimane, Y., and Noji, H. (2019) Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array, *Sci Adv* 5, eaav8185.
- [10] Soga, N., Ota, A., Nakajima, K., Watanabe, R., Ueno, H., and Noji, H. (2020) Monodisperse Liposomes with Femtoliter Volume Enable Quantitative Digital Bioassays of Membrane Transporters and Cell-Free Gene Expression, *ACS Nano* 14, 11700-11711.