

MERIT インターンシップ報告書

理学系研究科化学専攻
生体分子研究室 博士3年生
MERIT 8期生
朱文超 (Wenchao Zhu)

実施期間

2022/1~2022/3

受け入れ先

オンチップ・バイオテクノロジーズ、開発部（本間宣行、石毛真行）

インターンシップのテーマ

セルソーターで細胞内蛍光センサーのスクリーニングによる最適化。

課題背景

カルシウムイオン (Ca^{2+}) の濃度変化は、筋収縮や神経伝達物質の放出など、重要な生理的なプロセスを制御している。 Ca^{2+} シグナル伝達の異常は、心血管疾患、アルツハイマー病などの多くの疾患と関連している。故に、 Ca^{2+} の基本的な役割を解明することは、生物学や医学の分野で重要な課題として認識されている。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の可視化はこうした生理機能の理解に対して非常に有効な手段であり、 Ca^{2+} センサーの開発は長年注目されている。現在までに、蛍光性 Ca^{2+} センサーの開発は20年以上にわたって進められてきた。一般に、合成 Ca^{2+} センサーとタンパク質ベースの Ca^{2+} センサーの2種類が広く使われている。合成 Ca^{2+} センサーに比べ、タンパク質センサーは、遺伝子情報 (DNA) を変異させ、その変異体をスクリーニングするだけで簡単に最適化することができる。しかし、タンパク質 Ca^{2+} センサーをスクリーニングするため、膨大な時間がかかるという問題がある。

そこで、より迅速かつ効率的な最適化プロセスを開発するために、オンチップ社が開発したドロップレット技術とセルソーティング技術をセンサー開発に応用した。ここでは、On-chip Droplet Generator を用いて平均1個の細胞を含むゲルボールを作り、最も蛍光強度の高いドロップレットをソートした。この方法により、一度に数千のバリエーションをスクリーニングできるようになった。

実験方法

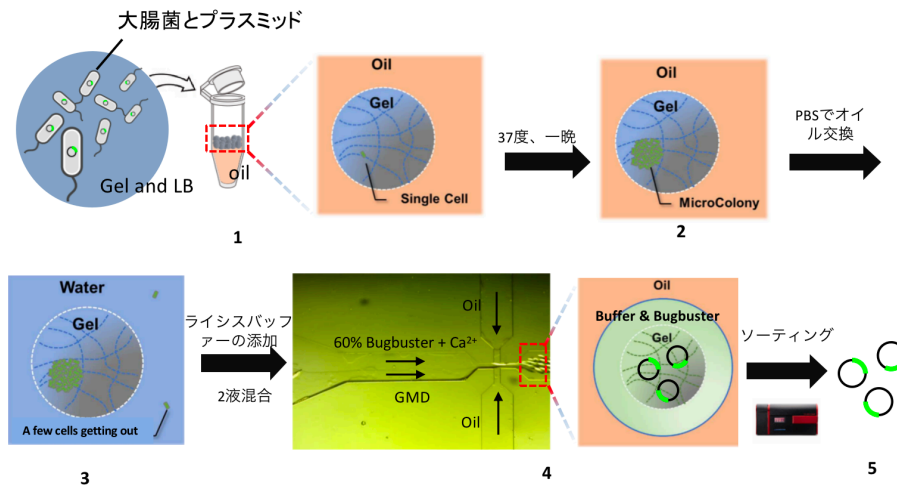


図 1

図 1 に示すように、まず (1)、ドロップレットジェネレータを用いて、オイルで単一コロニーを含むゲルボールを作製する。次に (2, 3)、37 度培養後のマイクロコロニーを観察することができ、PBS 緩衝液でオイルの置換を行う。その後 (4)、マイクロコロニーの溶菌と蛍光タンパク質の蛍光を測定するため、再びドロップレットジェネレータを用いて、ゲルボールの水溶液とライシス溶液を混合したドロップレットを作製する。37 度で 1 時間培養し、ドロップレットに蛍光タンパク質が充満している。(5) ドロップレットをスクリーニングし、蛍光強度が最も高いゲルボールを回収する。

実験結果

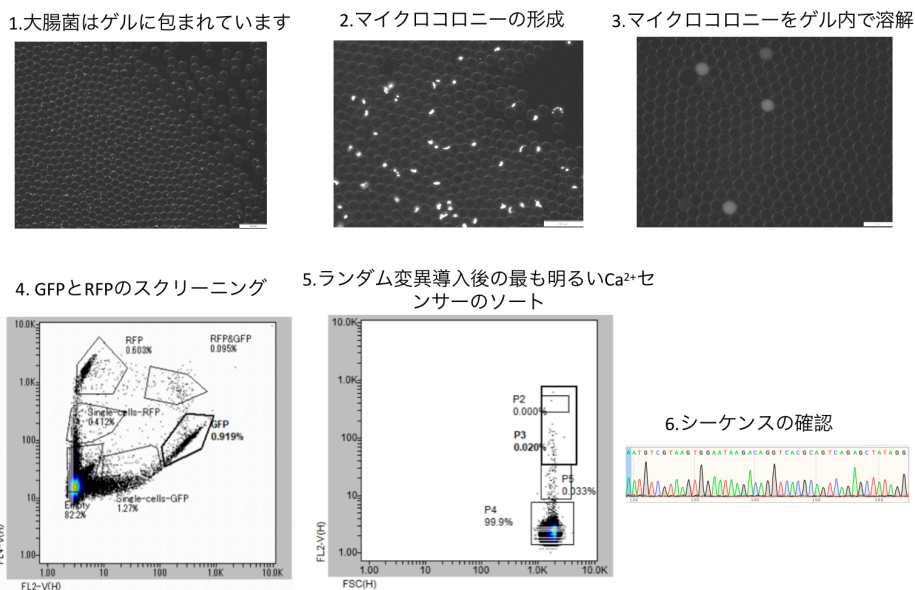


図 2

実験結果は図 2 に示すように、1. コロニー濃度を制御することにより、シングルコロニーをゲル内に封入することに成功した。2. 37 度で一晩培養した後、ゲル内にマイクロコロニーを得ることができた。3. その後、ゲルボールをドロップレットに包まれてバグビュスターと混合し、コロニーを溶解させた。4. GFP & RFP 二種類蛍光タンパク質をソートすることに成功した。5. ランダム変異導入後、Ca²⁺センサー (GCaMP6) の変異体ライブラリーを混合したものをオンチップソーターでソートすることに成功しました。6、ソーティングされたドロップレットの DNA を抽出し、シーケンスを確認した。

結論と展望

オンチップドロップレットジェネレータとオンチップソーターを利用し、蛍光強度や波長に基づいて、蛍光タンパク質を用いたタンパク質複合体を解析・選別するワークフローを開発した。将来は、この技術がタンパク質工学を加速させる強力なツールとなることを期待している。

謝辞

本インターンシップを受け入れ、ご指導頂いた本間さんと石毛さんに心より感謝申し上げます。このインターンシップをご支援頂いた本研究室 Campbell 教授、寺井琢也准教授、貴重なインターンシップの機会をご提供頂いた MERIT プログラムに心より感謝申し上げます。