

マイクロ流路デバイスを用いた セルフリータンパク質進化

寺坂尚紘^{*1} 磯崎瑛宏^{*2}

Microfluidics-based Cell-free Protein Evolution

Naohiro TERASAKA^{*1} and Akihiro ISOZAKI^{*2}

Directed evolution has enabled the engineering of high-performance enzymes and biosensors; however, evolving proteins that require multi-condition evaluation remain limited by the trade-off between throughput and experimental complexity. In this project, we aim to establish a high-speed, cell-free droplet-based protein evolution platform by integrating advanced microfluidic device engineering with an optimized cell-free translation system. To enable accurate two-state screening, we developed a high-accuracy droplet pair-matching method using independently controlled reference particles to decouple matching signals from target molecule signals. We also developed a prototype of mScarlet-based lactate biosensor using cell-free droplet screening, achieving a fourfold improvement in signal-to-noise ratio. These results establish the foundation for high-throughput, multi-condition protein evolution and pave the way for developing high-performance lactate sensors for intracellular imaging applications.

1. 研究背景

バイオテクノロジーの発展により、タンパク質を人為的に改変することが可能となり、酵素や医薬品など多様な機能性分子が創出されてきた。2018年のノーベル化学賞の対象となった進化分子工学研究では、多数のタンパク質変異体（数百～数百万種類）から機能が向上した変異体を選抜し、さらに変異導入と選抜を繰り返すことで、天然タンパク質を超える性能を持つ分子を創出できることが示された。一方で、標的分子の有無によってシグナルが変化するバイオセンサーや、基質選択性や温度依存性を有する酵素など、高度な機能を備えたタンパク質を進化させるためには、複数条件下での活性評価が不可欠である。しかし、実験系が複雑化すると同時に評価可能な変異体数（スループット）が制限されるというジレンマが存在する（図1）。例えば、マルチウェルプレートを用いた分子進化系では、スクリーニング可能な変異体数は数千程度であるものの、異なる二条件（例：リガンド存在下/非存在下）での活性測定を比較的容易に実施できる。一方、マイクロ流路技術を用いて作製したwater-in-oil液滴（ドロプレット）に、異なるタンパク質変異体を発現する細胞を1個ずつ封入することで、蛍光を指標に約 10^6 種類規模の変異体を高速にスクリーニングすることが可能となっている。また、細胞発現系ではタンパク質発現に数日を要するが、無細胞翻訳系を用いることで発現時間を数時間程度に短縮できる。しかしながら、液滴マイクロ流路を用いて二状態測定を実施する場合、液滴操作や再分配工程が必要となり、スクリーニング効率が約1/100程度に低下するという課題がある。

そこで本共同研究では、立命館大学の磯崎が有する高度なマイクロ流路デバイス設計技術と、東京科学大学の寺坂が保有する高速タンパク質発現を可能とする改良型無細胞翻訳技術を融合することにより、複数条件下での活性評価と高スループット性を両立した高速無細胞タンパク質進化システムの構築を目指す。さらに本システムを活用して、神経細胞活動や免疫応答に関わる乳酸を検出可能な高機能蛍光タンパク質センサーの開発を行う。

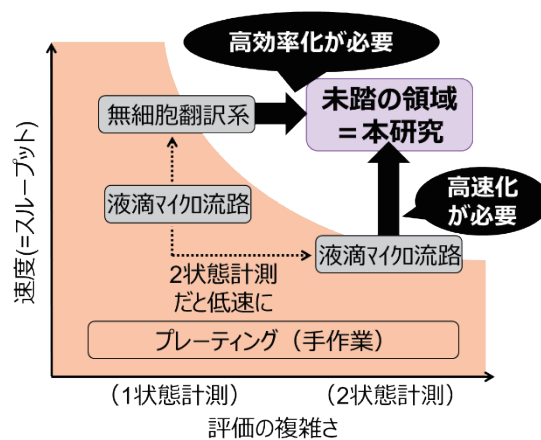


図1 タンパク質進化工学の現状。

2026年3月1日 受理

豊田理研スカラー共同研究Phase1

^{*1}東京科学大学未来社会創成研究院地球生命研究所

^{*2}立命館大学理工学部機構工学科

2. 二状態液滴マイクロ流路スクリーニングを目指した、高精度ペアマッチング法の確立

バイオセンサーや酵素の性能評価では、ON/OFF 信号比 (S/N 比) が重要な指標となる。そのため、タンパク質をマイクロ流路でスクリーニングする場合、OFF 状態および ON 状態をそれぞれ測定し、その結果を正しく対応付ける「ペアマッチング」が不可欠である。特に、反応時間を確保するために数百ミリ秒の遅延を伴う二点検出系では、時間差をもって流れるドロップレット同士を高精度に対応付ける必要がある (図 2)。

従来法では、標的分子由来の蛍光信号パターンを時間領域で照合することによりペアマッチングを行っていた。しかし、単一分子封入条件では分子封入がポアソン分布に従うため、平均封入数は約 0.1 分子/ドロップレットに設定される。このような低濃度条件下では信号パターンの組み合わせ数が限定されるため、時間ジッターやスループットの増大に伴いマッチング誤差率が上昇するという課題があった。

そこで本研究では、標的分子信号とペアマッチング信号を分離する新規手法を提案した (1, 2, 3)。具体的には、濃度を独立に制御可能な「参照粒子 (reference particles)」を導入し、その有無をデジタル信号 (1/0) として利用することで、ペアマッチング精度を向上させる方法である。これにより、標的分子の封入確率に依存せず、マッチング用 ID パターン数を増加させることが可能となる。

理論モデルを構築し、誤差率 E を以下の式で評価した：

$$E = 1 - \left(\frac{n_{id}-1}{n_{id}} \right)^{\Delta t e_t T-1} = 1 - \left(\frac{nCv-1}{nCv} \right)^{\Delta t e_t T-1}$$

ここで、n は ID ドロップレット数、v は参照粒子含有ドロップレット数、 Δt は遅延時間、 e_t は検出点での時間ジッター、T はスループット (単位時間あたりのドロップレット数) を示す。理論解析の結果、参照粒子含有率 $v = 0.5$ のとき ID パターン数が最大化され、誤差率が最小となることが示された。スループット 2,500 events/sec, ID ドロップレット数 10 の条件では、従来の単一分子条件 ($v = 0.1$) と比較して誤差率が約 9.2 倍改善されることが理論的に示された。実験的検証として、遅延チャンネルを備えたドロップレット生成デバイスを作製し、10 μm 参照粒子を封入したドロップレットを高速カメラで撮影した。粒子有無を二値系列に変換し、理論モデルに基づいてペアマッチング誤差頻度を評価した。その結果、参照粒子含有率約 0.5 付近で誤差頻度が最小となり、 $v \approx 0.45$ では $v \approx 0.10$ 条件と比較して約 9 倍の改善が確認された。また、ID ドロップレット数の増加に伴い誤差頻度が単調減少することも実証され、理論予測と良好に一致した。さらに、参照信号の識別を二値 (0/1) から三値へ拡張する理論試算を行った結果、従来法と比較して 100 倍以上のマッチング誤差率低減が可能であることが示された。また、識別エラーを一定割合含めた現実的条件下においても、マッチング誤差率を約 2% 程度まで抑制できる可能性が示唆された。

本研究は概念実証段階であるが、提案手法がドロップレット二点検出系におけるペアマッチング精度を大幅に向上させ得ることを理論および予備実験の両面から示した。今後は、二点同時測定系での直接的な精度評価、参照粒子の位置・数の揺らぎの影響解析、バイオセンサー・酵素系との適合性評価、さらにドロップレットサイズ最適化 (細胞生存率とソーティングスループットのトレードオフの検討) を進める必要がある。

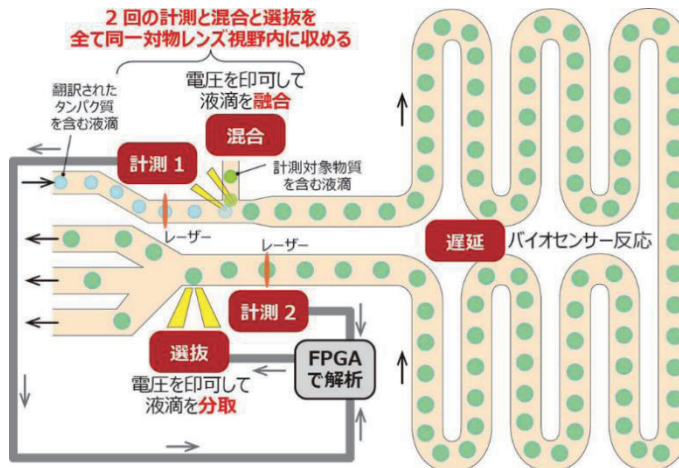


図 2 二状態スクリーニングの概要。

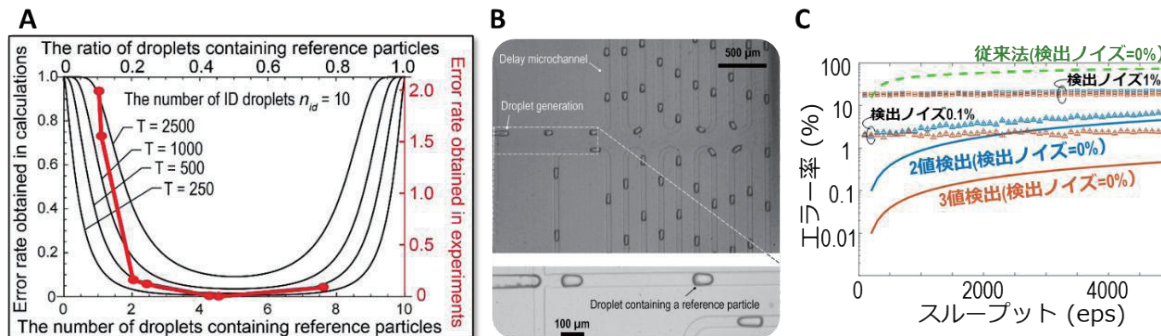


図 3 高精度ペアマッチング法。(A) 検出誤差ゼロと仮定したマッチング精度の理論計算 (黒) と実験値 (赤)。(B) 実験時の高速カメラ像。(C) 検出を高度化して検出誤差を考慮した場合のマッチング精度。

3. 赤色蛍光タンパク質 mScarlet をベースにしたプロトタイプ乳酸センサーの設計と進化

二状態スクリーニング法の確立と並行して、乳酸センサーの機能は無細胞翻訳系で評価し、その性能向上が可能かどうかを検討した。ドロップレットスクリーニングでは、直径約 25 μm のドロップレット内に無細胞翻訳系と、異なるタンパク質変異体をコードした DNA を 1 分子ずつ封入し、ドロップレット内でタンパク質を発現させる必要がある。直径約 25 μm のドロップレットに DNA を 1 分子封入した場合、その濃度は約 0.2 fM に相当する。一般的な無細胞翻訳系における至適 DNA 濃度は数 nM であり、0.2 fM という極低濃度条件ではタンパク質発現量は通常、検出限界以下となる。

寺坂はこれまでの研究において、無細胞翻訳系中の RNA ポリメラーゼおよびリボソーム濃度を最適化することで、ドロップレット内の単一 DNA 分子からのタンパク質翻訳量を約 10 倍向上させることに成功している。さらに、この改良型無細胞翻訳系が一状態ドロップレットスクリーニングに適用可能であることを実証した (4, 5)。本研究では乳酸センサーの分子進化実験に先立ち、pH 感受性が低い赤色蛍光タンパク質 mScarlet に、ペプチドリンカーを介して乳酸結合タンパク質を融合したプロトタイプセンサーを設計した (図 4A)。野生型 mScarlet およびプロトタイプセンサーを大腸菌で発現・精製し、乳酸の有無における蛍光強度を測定した。その結果、プロトタイプセンサーの蛍光強度は野生型 mScarlet の約 1% であったが、 $\Delta F/F = 1.50$ の乳酸依存的な蛍光変化を示した (図 4B)。

これまでのバイオセンサー研究において、蛍光タンパク質とリガンド結合タンパク質を連結するリンカー配列の最適化が、センサー性能に極めて重要であることが示されている。そこで本研究では、プロトタイプセンサーの $\Delta F/F$ 値の向上を目的として、mScarlet と乳酸結合タンパク質を連結するペプチドリンカー配列をランダム化した DNA ライブラリーを構築した。リンカー長は N 末端側および C 末端側それぞれ 1~4 アミノ酸とし、理論上取り得る全組み合わせを網羅するライブラリーを複数作製した。既報の一状態無細胞翻訳系ドロップレットスクリーニング系を用い、乳酸存在下で蛍光強度の高いドロップレットを各ライブラリーから選別し、次世代シーケンサーにより配列解析を行った。その結果、無細胞翻訳系において乳酸依存的な蛍光強度変化を示す変異体 (Hit#4) を同定した。Hit#4 を大腸菌で発現・精製し、乳酸依存的な蛍光変化を評価したところ、 $\Delta F/F = 6.06$ を示し、プロトタイプセンサーと比較して約 4 倍の機能向上が確認された (図 4B)。

さらに、Hit#4 を HeLa 細胞内で発現させ、細胞内におけるセンサー機能を評価した。Hit#4 は HeLa 細胞内で均一に発現した (図 4C)。HeLa 細胞をグルコース飢餓状態にした後、培地にグルコースを添加して細胞内乳酸濃度を上昇させ、蛍光強度変化を画像解析により評価した。その結果、細胞内での $\Delta F/F$ は約 0.1 であり、Hit#4 が細胞内においても乳酸依存的に蛍光強度を変化させることを確認した。乳酸のライブセルイメージングに応用するためには、試験管内における $\Delta F/F$ がおよそ 20~30 程度であることが一つの目安とされる。そのため、Hit#4 の性能をさらに 4~5 倍程度向上させる必要がある。現在、Hit#4 に追加変異を導入した第 2 世代ライブラリーの設計およびスクリーニング実験を計画している。

なお、本実験では乳酸存在下のみで選抜する一状態スクリーニングを実施したため、乳酸非存在下でも高蛍光を示す変異体が選抜された可能性は否定できない。この課題を解決するため、実験系の整備が完了次第、乳酸存在下および非存在下の両条件で選抜を行う二状態スクリーニングへ移行する計画である。

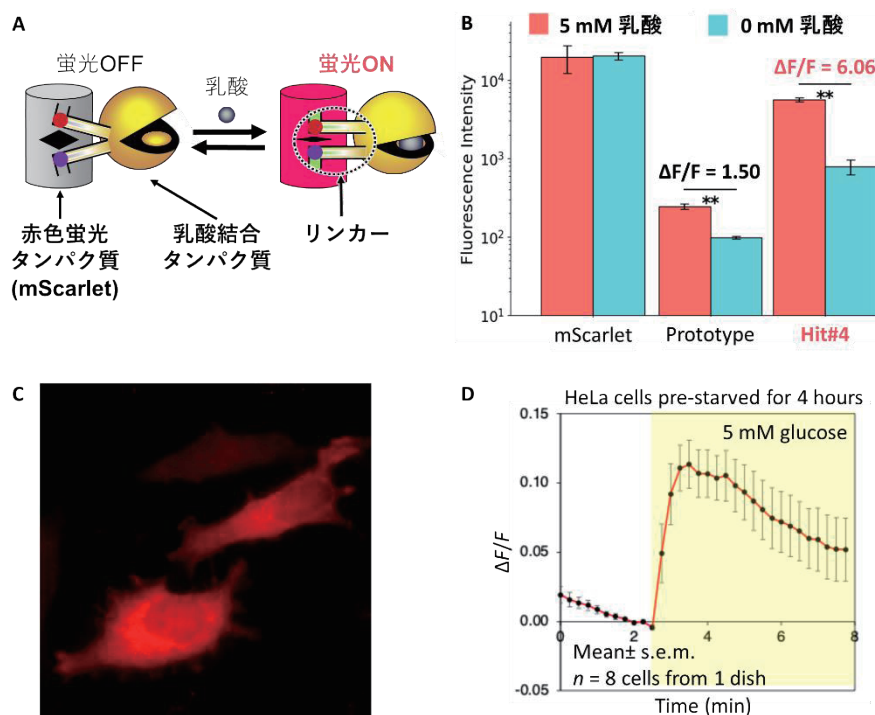


図 4 (A) mScarlet をベースにした乳酸バイオセンサーの設計. (B) 試験管内におけるバイオセンサーの乳酸依存的な蛍光シグナルの変化. (C) HeLa 細胞で乳酸バイオセンサー Hit#4 を発現したときの蛍光顕微鏡写真. (D) 細胞内における、乳酸バイオセンサー Hit#4 の蛍光強度変化.

4. 結語

本共同研究により、タンパク質分子進化に適用可能な高精度ペアマッチング法を含む二状態計測ドロップレットスクリーニングの理論を構築した (1, 2, 3). 現在, 更なるシミュレーションによる検討を進めるとともに, 実験系の構築に取り組んでいる. また, 既存の一状態計測ドロップレットスクリーニング法と無細胞翻訳系を適用することで, mScarlet ベースの乳酸センサーのプロトタイプを導出することに成功した. 細胞内で乳酸をイメージングするには更なる機能向上が必要になるため, 二状態スクリーニング法を活用して, より高性能な乳酸センサーの開発に取り組む計画である.

5. 謝辞

本研究にあたっては, 寺坂・磯崎研究室のメンバーならびに共同研究者の那須雄介博士 (東京大学) の協力があったて遂行できた. この場を借りて感謝申し上げます.

REFERENCES

- 1) 磯崎瑛宏, 那須雄介, 寺坂尚紘, 液滴分取装置及び液滴分取方法, 特願 2025-002732.
- 2) A. Isozaki, Y. Nasu and N. Terasaka, *IEEE 38th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2025)*, 2025.
- 3) 工藤凜和, 寺坂尚紘, 平松光太郎, 那須雄介, 磯崎瑛宏, *化学とマイクロ・ナノシステム学会第52回研究会*, 2025.
- 4) T. Furubayashi, N. Terasaka, K. Tajima and H. Noji, *bioRxiv*, 2026, doi.org/10.64898/2026.02.22.707295.
- 5) N. Terasaka, T. Furubayashi, K. Tajima and H. Noji, *bioRxiv*, 2026, doi.org/10.64898/2026.02.23.707346.