

Title	静電インクジェットを用いたbias-free定方向進化分子のためのin-vitro compartmentalization 法の開発
Author(s)	BINEET
Citation	
Issue Date	2016-06
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/13721
Rights	
Description	Supervisor:高村 禪, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	BINEET		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第402号		
学位授与年月日	平成28年6月24日		
論文題目	Development of a Novel In-Vitro Compartmentalization Method for Bias-Free Directed Evolution using Electrostatic Inkjet (静電インクジェットを用いた bias-free 定方向進化分子のための in-vitro compartmentalization 法の開発)		
論文審査委員	主査	高村 禅	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		下田 達也	同 教授
		芳坂 貴弘	同 教授
		濱田 勉	同 准教授
		一木 隆範	東京大学 教授

論文の内容の要旨

Directed evolution is laboratory evolution by imitating the natural evolution in the test tube and focused at molecular level for a particular property. It comprises of, a library of millions-of-millions molecules and selection method for desired function. Selection of variants has been performed by linking gene encoding molecule *viz.* DNA/RNA and its expressed phenotype as genotype-phenotype (g-p) linkage. Over the period of time, many biomolecular display technologies like phage display, ribosomal display, mRNA display and so on has been discovered for directed evolution, but all these technologies lacks the proper handling of millions of molecules, which give rise to the adulterated outcomes (biased). The current scenario lacks the detailed knowledge of selection method for evolution experiments. Griffiths et al have shown in vitro compartmentalization (IVC) by encapsulating the biomolecules using water-in-oil emulsion. This technology provided efficient g-p linkage inside water droplets but selection of molecules still have problems discussed above. IVC by water-in-oil emulsions have limitations of polydispersity that creates the improper monitoring over evolution. Later droplet based microfluidics has overcome this problem by generating monodisperse droplets, but this technique has limitation of small size droplets production with high throughput droplet generation speed. So I planned to develop new method for monodisperse high throughput IVC droplets using electrostatic inkjet for the bias-free selection system in directed evolution.

The nozzle head of electrostatic inkjet was dipped in oil phase and on voltage application water-in-oil droplets generated termed as immersed electrosprays. A nozzle size of 4 μm was filled with aqueous phase and dipped in oil phase (mixture of ABIL EM 90 (50%), Tegosoft DEC (36%) and mineral oil (14%)) for generation of water-in-oil droplets at 50 V and 100 Hz. When voltage applied to the nozzle

water surface started deformation and at threshold voltage it forms a Taylor cone followed by water jet stream which leads to generation of water droplets. The average size of water droplets was found to be $\sim 1.3 \mu\text{m}$ (CV = 12%) with generation speed of 10^5 droplets per second. By using high speed camera and it is found that ~ 108 droplets were generated in single pulse. Further parameters affecting the droplets size like nozzle size, oil viscosity and bias voltage were optimized. Increase in nozzle size, increases the droplet size with high degree of polydispersity due to different jet mode of droplet formation. Increase in viscosity also increases the average droplets size due to increase in hydrophobicity of oil phase. High voltage is analogous to the flow rate, so increase in voltage large droplets size were generated while higher frequency reinforced the smaller size.

Green fluorescent protein (GFP) – cDNA along with PURE system was taken in inkjet nozzle and biomolecules were encapsulated in water droplets using immersed electrosprays. Then all droplets were incubated for protein synthesis at 37°C for 2 h. The successful expression of GFP in immersed electro sprayed water droplets was observed. Time course study of GFP expression revealed early saturation of GFP expression within 9 to 15 min for small droplet volume (1.8 fL). This can be understood by the fact of miniaturization of compartments enhance the reaction kinetics of protein expression with rapid consumption of key raw materials like amino acids.

Conventional method of selection involves the bulk treatment of variants to the target molecule, this may leads to intermolecular and bias the outcome of selection. Compartmentalized selection by femtoliter droplets provides platform for better understanding of selection system. With the help of immersed electrosprays ultralow agarose droplets (melt over 60°C and gelled below 10°C) was generated in oil with average size of $\sim 1.7 \mu\text{m}$ using $15 \mu\text{m}$ nozzle size at 500 V and 100 Hz. The successful encapsulation of target beads inside agarose gel-in-oil beads. Similarly encapsulation and washing of Cy5-ssDNA in agarose gel-in-oil beads and performed washing steps using acetone and isopropanol.

In conclusion, sub-femtoliter water-in-oil droplets were generated using immersed electrospray with the generation speed of 10^5 droplets per second. The parameters like nozzle size, oil viscosity and applied voltage were investigated for the droplets size manipulation. Successful GFP expression in water-in-oil droplets with the early saturation between 9 to 15 min. For the minimal volume selection-in-a-fL droplets, ultralow agarose-in-oil gel beads of $\sim 1.7 \mu\text{m}$ size were generated using immersed electrospray. The washing of Cy5-ssDNA inside agarose gel beads were demonstrated by using acetone and isopropanol.

Keywords: In vitro compartmentalization (IVC), water-in-oil droplets, immersed electrosprays, cell-free protein expression, selection-in-a-fL droplet

論文審査の結果の要旨

本論文は、定方向進化分子工学をより効率化するために、in vitro compartmentalization (IVC)に用いられる一定サイズの油中水滴を、静電インクジェットを用いて高速に生成する手法

の開発に関するものである。生成された IVC 内でのタンパク合成の評価や、一粒子導入、高分子マトリックスの導入とゲル化も実現している。これらにより、より大規模なライブラリを容易に扱い、遺伝子系と表現型の安定なリンク形成し、またバイアスの少ないセレクションが可能になると考えられる。

第 1 章では、単一分散のサブ fL 油中水滴型コンパートメントを高速で生成するために、深沈型静電インクジェット法を開発している。先端径を 4~60 μm まで先鋭化したキャピラリーに、封入したい水溶液を入れ、界面活性剤を添加した油中に先端を深沈して 1000V、50~1000Hz 程度のパルスを印加することで油中水型液滴が生成される。界面活性剤は液滴が再結合することを防ぐ。界面活性剤の量や、油の粘性、キャピラリーの先端径、電圧印加条件が液滴の生成に及ぼす影響を調べ、最終的に直径 1.3 $\mu\text{m} \pm 12\%$ 程度の微小液滴を、105 個/秒以上の速度で、安定に生成することに成功した。

第 2 章では、1 章で開発した方法で生成した液滴を IVC として用い、各液滴の中でタンパクの合成が可能かどうか、またその合成効率を調べている。無細胞タンパク合成系である PURE system と緑色蛍光タンパク GFP の DNA をキャピラリーの中に入れ、本法を用いて油中水滴の中に封入したところ、水滴の中でタンパクの合成が確認できた。発現量は IVC を用いないバルク系で行った実験とほぼ変わらず、静電インクジェット課程が酵素や DNA に悪影響しないことが確認できる。発現速度は粒径に依存して変化するが、概してバルク系よりも早く殆どの条件で 15 分以内に飽和濃度に達していることが分かった。

第 3 章では、本法をよりバイアスの少ない定方向進化分子工学に用いるために、ビーズの封入と洗浄性を調べている。ビーズ封入実験では、4 ミクロンの液滴に 1 ミクロンのビーズをかなりの確率で 1 対 1 封入できることを確かめた。また、低融点アガロースを封入した実験では、直径約 1.5 μm の均一サイズのゲル化 IVC が生成できることが分かった。このような高分子は粘性を上昇させ通常のインクジェットでは吐出が難しい。ゲル化 IVC を用いて、IVC を破壊せずに洗浄操作ができることを示した。ゲル化 IVC は、IVC の水溶液中でのハンドリングを容易にし、生体分子の Native な構造を安定化し、また分子量選択的な洗浄を可能とすることから、よりバイアスの少ないセレクションに特に有利と考えられる。

以上、本論文は、深沈型静電インクジェット法を IVC 高速生成に初めて応用し、進化分子工学に非常に適した IVC 生成技術を確立したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。