

論文の内容の要旨

論文題目 ランダム配列核酸ライブラリーを用いた機能性タンパク質創製法の開発

氏 名 井 上 敦

緒言

タンパク質は生命体を維持する上で必要となる様々な機能を有し、その優れた特性から工業用酵素、医療用、研究用試薬などとして幅広く応用されている。ゲノム情報の解読や、数千個規模でのタンパク質立体構造解析がなされ、タンパク質の一次配列、立体構造と機能について膨大な知識が蓄積されつつあるが、それらを統合し、新しい機能をもつタンパク質をデザインし創製することは決して容易ではなく、さらなる研究が必要である。その一方で、コンビナトリアルケミストリーの概念を取り入れた手法、つまり、非常に多くの核酸レベルのライブラリーを用意し、その中から目的の機能を有するタンパク質のみを選び出すという方法成果を上げている。

本研究ではコンビナトリアルバイオエンジニアリングの概念のもとに、効率よく結合性タンパク質を選択できる *in vitro* タンパク質選択システムの開発と、細胞の内部で発現させることによって細胞の表現型を変化させることができる機能性タンパク質（細胞内抗体）の創製法の開発を行い、これらの方法論の有用性を示した。

リボソームディスプレイ法に基づく、新規機能性ペプチド選択法の開発

機能性タンパク質選択法にはフェージディスプレイ法、mRNA ディスプレイ法、STABLE法などが知られているが、そのいずれにも共通する目的は、機能を果たすタンパク質とそれをコードする遺伝子情報を1対1でカップルさせる、ということである。リボソームディスプレイ法では mRNA から終止コドンを除くことで、強制的にリボソームを mRNA の 3' 末端で停止した状態とさせ、翻訳されたタンパク質と mRNA をリボソームを介してリンクさせる。これらのステップは生体に依存することなく、すべて試験管内反応で行えるため、 10^{10} 以上の膨大な多様性を持つライブラリーに対して、また生体に対して毒性を持つタンパク質の選択にも応用が可能である。このような性質から、リボソームディスプレイ法は比較的簡便かつ迅速に目的とするタンパク質を選択することができるシステムとして期待される方法である。

しかし、現状では、タンパク質選択法としての応用例は少数に留まっている。この原因としては、リボソームによるタンパク質と mRNA の連結は非共有結合的であり、一端リボソームから解離してしまうと目的の mRNA が回収されず、その結果として選択効率が低下してしまうためであると考えられる。そこでタンパク質と mRNA の連結をより強固なものとするために、mRNA とタンパク質が直接相互作用するような仕組みを導入した (図 1 A)。mRNA 上に HIV 由来のステムループ型の構造をとる TAR 配列を、またディスプレイされるタンパク質側に TAR と相互作用する Tat ペプチドを発現させることで、図のようにリボソームの他にもう 1 点で mRNA とタンパク質を連結させた。図 1 B に示した TAR 配列のほかにも、相互作用しないステムループ構造の RNA を導入したもの、さらに TAR より強力に結合する RNA として人工的に作られた Tat Aptamer の 3 種類を持つ mRNA を用意し、FLAG ペプチドをモデルとして mRNA の回収量の比較を行った。

Tat ペプチドとの相互作用をまったくしないコントロールのステムループ構造に比べ、TAR 配列を導入した場合、mRNA の回収量が増加し、さらにより強力な相互作用をするとされている Tat Aptamer を導入することで、さらに回収量の上昇が見られた (図 1 C)。FLAG をコードしない mRNA の回収率はいずれも同定度であるので、回収率の差は RNA 構造がもたらすものではないことが分かる。この結果から新しく導入した mRNA とタンパク質の相互作用は選択的に mRNA の回収量を上昇させる効果があることが明らかとなった。

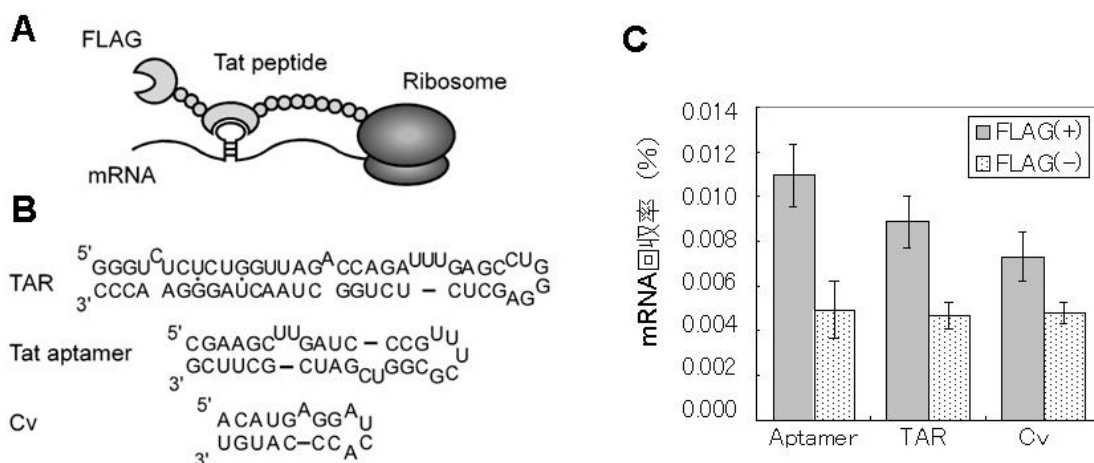


図 1. A. リボソームディスプレイ法に基づく新規機能性ペプチド選択法。B. mRNA に導入した RNA モチーフの配列と二次構造。Cv はネガティブコントロールとして用いたステムループ構造。C. FLAG 抗体を用いた一回の選択における mRNA の回収率。翻訳反応に用いた mRNA 総量を 100%としている。

動物細胞を標的とした *in vitro* 選択法

膜表面に存在するタンパク質は細胞種を見分けるマーカーとして有効であり、また創薬における標的として重要なターゲット分子であるが、その多くは疎水性が高く、大量に精製することが困難であり、*in vitro* 選択法の標的分子として用いることは難しい。*in vitro* 選択法においてアフィニティ選択する際の固定担体として動物細胞を用いることができれば、細胞膜表面の膜タンパク質に結合するタンパク質を迅速に選択することができる。そこで、モデル系としてチロシンキナーゼ受容体である Her2 とそれと特異的に結合する人工分子である Her2 binding protein を用いて検討を行った。その結果、コントロールとして用いた結合能力を持たない欠損タンパク質をコードするものに比べ、約 6 倍量程度の Her2 binding protein をコードする mRNA を選択的に回収することが可能であった (図 2)。また、Her2 を発現していない細胞を用いると mRNA の特異的な選択ができないこと、リボソーム上に提示される Her2 binding protein と同様のタンパク質を大過剰量、選択溶液中に加えると mRNA の回収量が選択的に減少することから、mRNA の選択は Her2 依存的であることが分かる。

この方法を用いることでリボソームディスプレイ法のような *in vitro* 選択法の応用領域が広がり、精製が困難な膜タンパク質に対する結合性ペプチドや機能阻害タンパク質の創製において有用なツールとなりうると思われる。

哺乳動物細胞内で機能する抗体の開発とその応用

細胞内抗体は細胞の内部で発現させた抗体フラグメントであり、高い特異性をもって細胞内部の抗原の機能を阻害することができる特異的機能阻害剤である。これまで病原性タンパク質を標的とした細胞内抗体を作り出す研究や、機能解析のための機能阻害法としての応用が試み

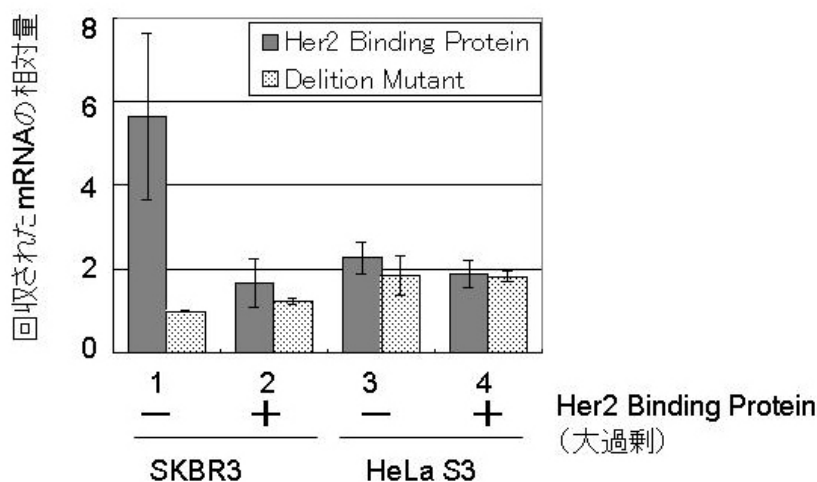


図 2. 動物細胞を固相担体として用いた選択における mRNA 回収量の比較。

られてきた。しかし、有効な細胞内抗体を得ることは難しく、そのため広い応用がなされていない。本研究では機能阻害剤としての細胞内抗体を効率良く創製するための新規方法論の開発を試みた。

本研究では、抗体分子のライブラリーを直接細胞に導入し、その中から細胞の表現型を変化させた細胞内抗体を単離同定する方法を試みた。この方法で得られた細胞内抗体は細胞の表現型を変えていることから、細胞内部で何らかの分子と相互作用し、重要な変化を与えるものであると期待できる。また、抗体の標的となった分子を同定することができれば、新しく標的タンパク質の機能と表現型を対応付けることができる。さらに本研究では、細胞内部で発現させる抗体としてシングルドメインのみからなる、シングルドメイン抗体を用いることとした。抗原の認識に重要な相補性決定領域 (CDR) のうち、最も重要とされる CDR 3 のみを 15 個の NNK コドンによりランダム配列化したシングルドメイン抗体発現ライブラリーを構築した。

癌細胞の走化性を表現型として選び、これを阻害する細胞内抗体のスクリーニングを試みた。シングルドメイン抗体発現ライブラリーを高転移性ヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 に導入し、走化性アッセイにより走化性が抑制された細胞を選択した (図 3 A)。この走化性アッセイシステムを繰り返すことにより走化性を阻害するだけでなく、wound healing 活性、細胞外基質を分解しての浸潤活性も抑制するクローン iAb-47 を得ることに成功した。

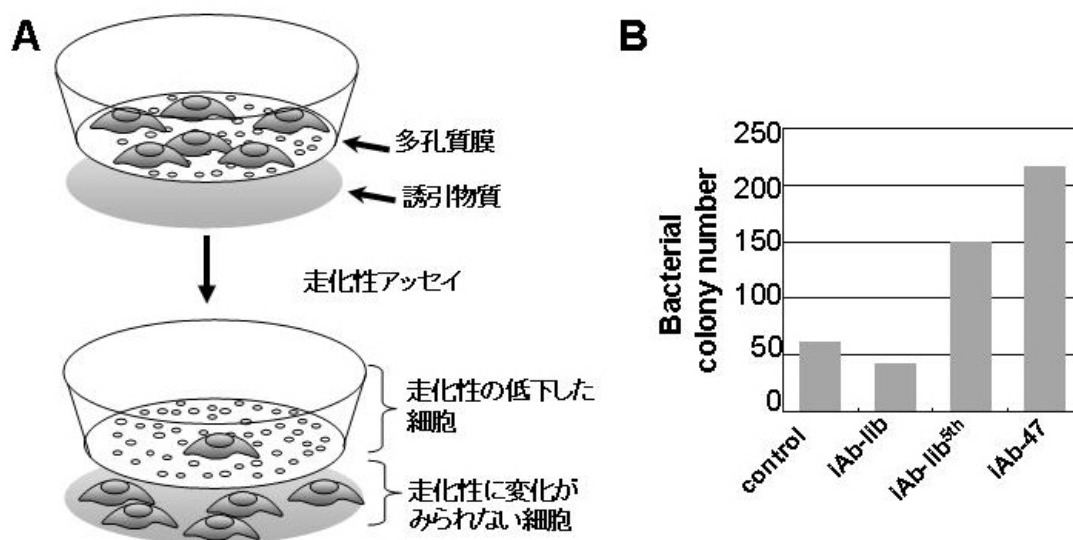


図 3. A. 走化性の抑制された細胞を選択するために用いた走化性アッセイ。細胞が通過できる程度の孔を持つ多孔質膜上に細胞を置き、膜の下側に誘引物質を含む培地を加え、細胞を膜の下側に移動するように誘引する。細胞内抗体の影響で運動できなくなった細胞のみが膜上に残る。B. 走化性アッセイにより回収された細胞群から抽出したプラスミドベクターを用いて大腸菌を形質転換した際に得られる大腸菌コロニー数。Control: リゾチームに対するシングルドメイン抗体、iAb-lib: 選択する前のシングルドメイン抗体ライブラリー、iAb-lib^{5th}: 4 回の選択を行った後に得られたライブラリー。

iAb-47 が相互作用する相手分子の同定

iAb-47 と相互作用するタンパク質を精製し、マスペクトル解析により解析を行ったところ hnRNP-K が同定された。hnRNP-K (heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein-K)は mRNA のプロセッシングを行うタンパク質として同定されたが、その後の研究で多くの生命現象に関わっていることが示唆されている。hnRNP-K は血清刺激により細胞質に蓄積するという報告がなされており、刺激によりダイナミックに局在を変えることでシグナル伝達を行っていると考えられる。解析の結果、iAb-47 はフィブロネクチン刺激による hnRNP-K の細胞質への蓄積を阻害することを発見した。これらの結果から、細胞外からの刺激によって細胞質に蓄積する hnRNP-K が走化性に関わる因子である可能性が示唆された。

上記のように hnRNP-K は細胞の走化性に関与する可能性が示されたが、このことは、細胞内抗体を使ったスクリーニング法を用いて初めて見出されたものである。一般に細胞機能を抑制してその表現型変化に基づく遺伝子機能のスクリーニングは RNAi 技術が用いられるが、遺伝子のノックダウンが致死である hnRNP-K のような因子は解析が困難であり、本研究のような細胞内抗体による機能阻害法は有効な手段となる。

結論

今回、新しく構築した mRNA-タンパク質相互作用を付加した *in vitro* 選択法は mRNA の回収率を上昇させる術として有効であり、分子標的医薬を目指す上で必要なターゲティング分子を創製する技術として重要な方法論となることが期待される。

シングルドメイン抗体を用いた表現型にもとづく細胞内抗体選択法は、機能性阻害剤の開発のみではなく、新しいタンパク質機能探索法としても有効であることを示すことができた。本実験で用いた細胞内抗体発現ライブラリーは、莫大な費用と時間、ゲノムワイドな RNAi ライブラリーなどに比べて遥かに簡単かつ低コストで構築することが可能である。以上のことから、本方法論は、RNAi 技術や従来の遺伝子ノックダウン法を補う方法となりえるものであり、今後の細胞機能の分子生物学的解析において有用なツールに発展すると考えられる。