

審査結果の要旨

氏名 井上 敦

本研究ではランダムな核酸ライブラリーの中から機能性タンパク質を創製するための方法論の開発を行った。巨大な多様性を持つライブラリーから目的の分子を選択するというコンビナトリアルケミストリーの概念のもとに、効率よく結合性タンパク質を選択できる *in vitro* タンパク質選択法の開発と、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）の選択法の開発を行い、これらの方法論の有用性を示すことに成功した。本研究で開発されたこれらの技術は工業、医療、研究など様々な分野で応用可能な機能性タンパク質を得るための技術として利用できる可能性がある。

第1章では新規機能性タンパク質を創製するために行われてきたこれまでの研究を概観し、非常に多くの組み合わせの生体分子ライブラリーの中から適合する分子をハイスループットに、かつシステムティックに選択する技術であるコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの概要を示した。

第2章では mRNA-タンパク質相互作用を付加した、独自の *in vitro* タンパク質選択法（改良型リボソームディスプレイ法）の開発を行った。mRNA と翻訳されたタンパク質とを相互作用させることによって、mRNA-リボソーム-タンパク質複合体の安定性を向上させ、従来のリボソームディスプレイ法よりも効率よく目的 mRNA を選択的に回収することができることを示した。本選択法はすべての実験操作を生命体に依存することなく、*in vitro* の実験手法のみにより行うことができ、実験条件の最適化を行うことでさらに成長できる技術であると期待している。また、リボソームディスプレイ法は抗体を模した機能性ペプチドを創製するなど基礎研究レベルで成果をあげ始めており、今回開発した選択システムも今後の医薬関連分野における有用な方法論となると期待できる。

第3章では *in vitro* タンパク質選択を行うにあたり、動物細胞を標的とした選択が可能であることを示した。このような選択手法を用いることで、細胞表面の膜に埋め込まれた天然の状態に近い標的分子に対して選択的に結合するタンパク質を創製することができるようになる。また、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。この技術は分子標的医薬や選択的ドラッグデリバリー、高感度イメージング技術に必要となる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可能性がある。

第4章ではシングルドメインからなる抗体フラグメントを人工的にランダム配列化した細胞内抗体発現ライブラリーを用い、細胞の表現型変化に基づくスクリーニングを行うことで機能性細胞内抗体の選択を行った。表現型として転移性癌細胞の運動能力に注目し、運動能力の変化に対するスクリーニングを行うことにより、細胞死を誘導することなく運動性を低下させる機能を持つ細胞内抗体を得ることに成功した。このようなアプローチをとることで一つのスクリーニングシステムのみから効率よく哺乳動物細胞に変化を与える機能性細胞内抗体を得ることが可能となる。

また、得られた細胞内抗体が細胞内部で関与している細胞内因子として hnRNP-K を同定した。hnRNP-K の細胞内局在の変化が細胞運動において重要であることが示唆されており、hnRNP-K は細胞の運動を制御する重要なタンパク質である可能性がある。これは、細胞内抗体発現ライブラリーを用いて初めて明らかとなった hnRNP-K の新規の機能であり、本研究の手法は新しいタンパク質機能探索法としても応用できる可能性がある。以上のことから、本方法論は、RNA 干渉法などの遺伝子発現抑制法や従来の遺伝子ノックアウト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期待できる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。