

論文内容の要旨

論文題目 再構築蛋白質翻訳系を用いた蛋白質スクリーニング
システムの開発

(Efficient protein selection based on ribosome display system
with purified components)

氏名 大橋 広行

近年、ヒトをはじめとした各種生物のゲノム情報解析により、膨大な数の遺伝子情報が蓄積されつつある。ポストゲノム研究においては、これらの膨大な遺伝子情報の中から、目的の機能を持つ分子の解析・選択を高精度で行うことが出来る技術の構築が強く望まれている。現時点では、生体高分子間相互作用を解析する方法として、ファージディスプレイ法と酵母ツーハイブリッド法が主流であるが、これらの方法は生細胞を用いるため、遺伝子改変の手順を伴い、この過程でライブラリーの大きさが制限されてしまうことや（一般的に分子種 10^8 以下）、宿主である細胞に有害な蛋白質の場合、発現効率が著しく低下することなどの問題がある。本研究では、理論的には理想的とされているが、実際的な成功例の少ないリボソームディスプレイ法（図1）を、当研究室で開発した PURE system（再構築蛋白質翻訳系、図2）を用いて確立し、さらに生体高分子間相互作用解析ならびに、高効率な機能分子選択手法へと発展させることを目的とした。リボソームディスプレイ法（図1）は、蛋白質翻訳反応中に形成される「mRNA-リボソーム-新生ポリペプチド」からなる複合体 (ternary complex)の形で蛋白質を提示させる技術であり、この複合体形成により表現型と遺伝子型のリンクを実現できる。しかしながら、従来のリボソームディスプレイ法は大腸菌 S30 などの細胞抽出液を用いていたため、ternary complex の安定的な維持が難しく、信頼性が高いとは言い難いものであった。この問題を解決するため、系中の因子を自由にコントロール出来、系の最適化を行える PURE system を用いることで、リボソームディスプレイ法の最適化を図った。分子選択実験のモデル系として、DHFR を competitor とし、単鎖抗体 (scFv-HyHEL10) の特異的選択を行った。mRNA の回収効率に着目して、リボソーム調製法の改良、リボソームの系中の濃度、シャペロンの添加など、いくつかの条件を最適化したところ、mRNA の回収率は投入した mRNA のおよそ 2.5 %以上となった。また、最適化した系を用い、2種類の mRNA の混合比を変えて目的遺伝子の増幅を調べたところ、initial pool 混合比が $1 : 10^5$ からでも1回の選択ラウンドで目的遺伝子の増幅が確認できた（表1、濃縮効率としては約 12,000倍）。これは従来の細胞抽出液を用いたリボソームディスプレイ法の成績が、mRNA 回収率 最高

0.2%、1回の選択ラウンドでの濃縮効率が20~250倍であると報告されているものと比較すると非常に優れた結果であった (Hanes et al., *PNAS*, 1997, 1999.)。また、他の *in vitro* 分子選択系と比較しても、最も高い選択効率であった (Griffiths et al., *Curr Opin Struct Biol*, 2005.)。さらに、複数回のセレクションラウンドを重ねることで、initial pool $1:10^8$ からの分子選択実験では2ラウンドで目的分子を確認し、3ラウンドでは完全に単離するまで至った (図3)。加えて、 $1:10^{10}$ からの特異的分子選択も3ラウンドで確認することが出来た (図3)。PURE system を用いた単鎖抗体の特異的選択系において、従来の細胞抽出液の無細胞蛋白質合成系を用いた場合よりも、ターゲット分子をきわめて高効率に選択出来ることを実験的に確認した。また、非免疫単鎖抗体ライブラリーから、新規抗体の取得に成功し、本方法の実用性を実証した。さらに、抽出液の翻訳系では困難であった温度条件 (37°C) においても、特異的セレクションを行えることを確認した。これは、nuclease などのような複合体を壊す因子が、新しく調製した PURE system 系中にほとんど存在しないことに起因すると考えられた。加えて、PURE system を用いたリボソームディスプレイ法の詳細な素過程解析を行い、ternary complex 形成による遺伝子型と表現型のリンクによる分子選択という、リボソームディスプレイ法の基本概念を、改めて明確に確認することが出来た。これは、従来の細胞抽出液を用いた系では、出来なかったことである。このように系中の因子を再構築し、最適化することで、本方法は従来の方法の限界を大きく打開した。

本研究をより進展させることで、新しい抗体分子の創出や蛋白質の網羅的機能解析といった、蛋白質研究のための高効率で信頼性の高い基盤技術となり、生命科学分野の進展や医薬分野、産業などの発展に大きく貢献できるものと期待する。

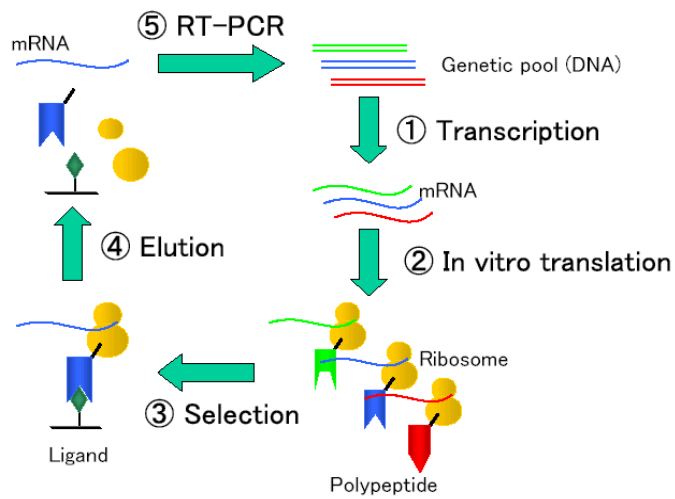


図1 リボソームディスプレイ法の模式図

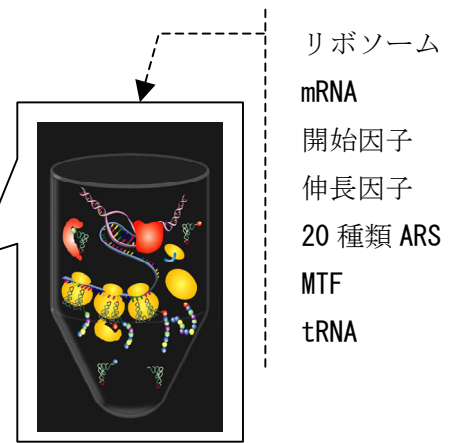


図2 PURE system を用いた試験管内翻訳

Molar ratio of initial pool	Molar ratio of recovered pool	Enrichment (Fold)
HyHEL-10 : DHFR	HyHEL-10 : DHFR	
$1 : 10^3$	$1 : 5.5 \times 10^{-1}$	1818
$1 : 10^4$	$1 : 3.2$	3125
$1 : 10^5$	$1 : 8.3$	12048

表1 1ラウンドセレクションの選択効率

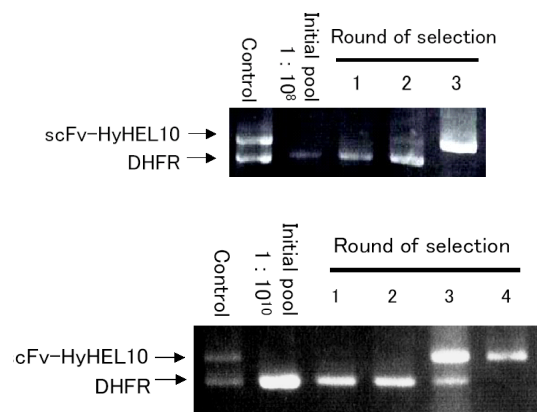


図3 複数ラウンドセレクション