

論文審査の結果の要旨

氏名 大橋 広行

本論文は3章からなり、第1章はPURE system (再構築蛋白質翻訳系) を用いたリボソームディスプレイ法の最適化、第2章はPURE system を用いたリボソームディスプレイ法の解析、第3章はランダムライブラリーからの分子選択について述べられている。

第1章 PURE system を用いたリボソームディスプレイ法の最適化

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、信頼性が高いとは言い難いものであった。論文提出者は、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、単鎖抗体 (scFv) の結合による mRNA の特異的回収実験を行った。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、mRNA の回収率は投入した mRNA の 2.5 % 以上となった。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 0.01 %~0.2 % 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。

第2章 PURE system を用いたリボソームディスプレイ法の解析

論文提出者は、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、mRNA-リボソーム-新生ポリペプチドから成る 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、改めて明確に確認している。従来の細胞抽出液を用いたシステムでは系中の因子を制御することが出来なかったため、リボソームディスプレイ系中の詳細な素過程解析が行えなかったが、論文提出者は PURE system の利点を有効に活用し、これを成した。

また、論文提出者は、最適化した系を用い、新たに構築した蛋白質スクリーニングシステム (Pure Ribosome Display) の選択効率の解析を行った。2種類の mRNA の混合比を変えて目的遺伝子の増幅効率を解析し、シングルラウンドで目的遺伝子を約 12,000 倍程度まで濃縮可能であることを示している。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、1回の選択ラウンドでの濃縮効率で、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。また、これは他の試験管内分子選択系と比較しても、最も高効率な成績である。さらに、複数回のセレクションラウンドを重ねることで、 $1:10^{11}$ からの特異的分子選択も可能であることも示している。

また、論文提出者は、従来の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、特異的分子選択を行えることを確認している。この結果は、PURE system を用い

たリボソームディスプレイ法が、既存の試験管内分子選択系の実験上の制約を、大きく打開したことを示すものである。

第3章 ランダムライブラリーからの分子選択

論文提出者は、確立した蛋白質スクリーニングシステムの実際的な有用性を示すため、非免疫マウス scFv ライブラリーからの抗原特異的抗体の取得実験を行った。リボソームディスプレイ法により、酵母 Sup35 に対する特異的な scFv のセレクションを行い、ELISA 試験において抗原特異的な結合能を示す scFv の取得に成功した。さらに、取得した scFv を一次抗体として用い、酵母抽出液に対するウェスタンブロットを行い、Sup35 の特異的なバンドを確認している。このように論文提出者は、Pure Ribosome Display が、実際のマウスナীব ライブラリーからも、抗原特異的抗体の取得が可能であり、実用的なツールであることを示している。

論文提出者の研究成果は、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することが期待される。

なお、本論文第1章は、上田 卓也教授、清水 義宏助手、イン ベイウエン博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。