

無細胞タンパク質ディスプレイ法とその医療産業への応用

Cell-free Protein Display Technology and the Application for Medical Industry

仲 大地
Naka Daiji

無細胞タンパク質ディスプレイ法は、生物由来あるいはランダムに合成された核酸ライブラリーを用い、これらから転写されたmRNAとその翻訳産物であるタンパク質が共有結合した分子（対応付け分子）を *in vitro* で形成させる技術である。本文ではこの技術の原理を述べるとともに医療産業への様々な応用例を紹介する。

Cell-free protein display (CFPD/IVV method) is a technology to make form covalent coupling of a mRNA, which is transcribed from nucleic acid library derived from organisms or random synthesized nucleic acids, to the protein that it encodes *in vitro*. In view of this, I introduce the principle of this technology and some applied examples for medical industry.

キーワード：無細胞タンパク質合成系，ディスプレイ法，ピューロマイシン，蛋白工学，機能性ペプチド

1 無細胞タンパク質ディスプレイ法とは

1.1 はじめに

タンパク質は生体の構造と機能の最も基本的かつ不可欠な担い手であり、それなくして生命はありえない。これらのタンパク質は遺伝子（DNA）からmRNAへの転写反応，そしてリボソーム等によるmRNAの翻訳反応の過程を経て合成され、他の生体分子と様々な相互作用を介して機能している。例えば、細胞レベルでは遺伝子に作用してそのスイッチのオン／オフに係る転写因子，標的とするタンパク質に対してリン酸化反応を示すシグナル伝達系の酵素，タンパク質間の相互作用を介して細胞の骨格形成に係る構造タンパク質などが挙げられる。これらのタンパク質の相互作用は、個体レベルにおいて生命活動の維持に必須であるとともに、一方では疾患を引き起こす原因となっている場合もある。

近年の膨大なゲノム解析の結果、ヒトの遺伝子上には生命活動において機能不明な数多くのタンパク質がコードされていることが判ってきた。このため、疾患の原因となるタンパク質の新たな機能を見出し、創薬研究を推進させる技術の開発が望まれている。例えば、遺伝子解析に関する技術

は一昔前と比較して飛躍的に解析のスピードと精度が向上しているが、これはPCR法など、試験管内 (*in vitro*) で簡便に遺伝子を何十万倍にも増幅（コピー）することができる技術が大きく貢献している。これに対し、目的とする活性を指標に精製されたタンパク質は直接増幅させる手段はなく、精製過程でその収量が減少するなど、タンパク質の機能解析は一般的に容易ではない。この問題を解決するアイデアとして、タンパク質とそのアミノ酸配列情報をコードした遺伝子が直接結合している分子の利用が考えられる。なぜならタンパク質の機能に基づき、標的物質との相互作用による選択（単離）操作の後、その核酸部分を増幅させることにより、選択（単離）されたタンパク質を同定することが可能となるからである。この原理を利用し、機能や活性が判明している物質（医薬化合物や生体分子等）を標的物質とし、これと結合するタンパク質を見いだした場合、これらのタンパク質は標的物質の機能や活性を調節する作用を持っていることが期待できる。

1.2 無細胞タンパク質ディスプレイ法の原理

無細胞タンパク質ディスプレイ法はタンパク質（生体における表現型）とその情報をコードした

核酸（遺伝子）が直接的に共有結合した分子を製作する技術であり、IVV法もしくはmRNAディスプレイ法とも呼ばれている^{1)~3)}。この技術はチロシルtRNAの3'末端と類似した構造をもつ抗生物質であるピューロマイシンの特性を利用している。この分子をリンカーを介してmRNAの3'末端に連結し、これを無細胞タンパク質合成系中でタンパク質の合成反応を行わせると、mRNAと結合したピューロマイシンはリボソームのAサイトに取り込まれ、ペプチド転移反応の基質として合成されたタンパク質のC末端に取り込まれる。その結果、mRNAの3'末端とタンパク質のC末端がピューロマイシンリンカーを介して共有結合で連結した分子（対応付け分子）が形成されるのである。（図1）

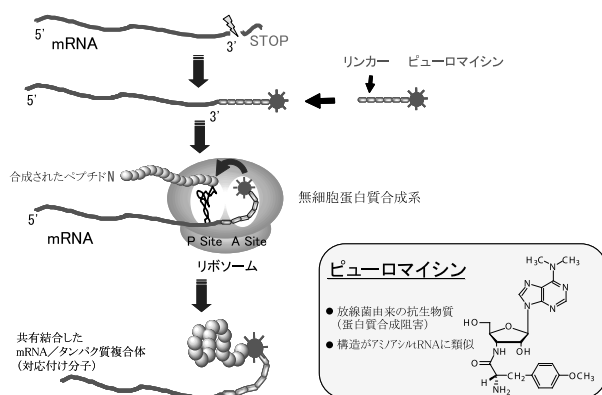


図1 対応付け分子の調製

1.3 無細胞タンパク質ディスプレイ法の実用化

従来、本技術の重要なポイントであるmRNAとタンパク質の連結（対応付け分子の形成）の効率が極めて低いことがこの技術の実用化を妨げていた。そこで我々は、この問題に係るピューロマイシンリンカーの立体構造上の問題を解消し、高い効率で対応付け分子の形成が可能かつ容易に合成可能なピューロマイシンリンカーを新たに開発した。さらに、高いタンパク質合成能を示す小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成系を自社で製造し、本技術に適用させた。これらの結果、本技術は医療産業における種々の研究活動に耐えうる強力な解析・開発ツールとして実用レベルに達し、我々自身、日々の創薬研究において必要不可欠な技術となっている。なお、本技術の名称に関

し、この技術が上記の無細胞タンパク質合成系を利用している特徴を踏まえ、名称から技術分野が容易に把握できるようにとの観点から、我々は無細胞タンパク質ディスプレイ法（Cell Free Protein Display Technology : CFPD法）と呼んでいる。

2 無細胞タンパク質ディスプレイ法の操作

2.1 濃縮サイクルの概念と実際の操作

CFPD法では解析対象となる物質に対し、相互作用する対応付け分子を簡便に濃縮することが可能である。その概念を図2に示す。まず解析対象となる物質を“釣竿の糸の先”（アフィニティービーズ）に固定し、生物由来あるいはランダムに合成された核酸より調製された対応付け分子のライブラリー（種々の対応付け分子から成る混合物）をこれに加える。次にタンパク質相互作用を介し、解析対象と対応付け分子が結合したものを釣り上げる（アフィニティービーズによる単離操作）。釣り上げられた対応付け分子にはタンパク質部分をコードする核酸（遺伝子）が含まれているため、この核酸部分をPCR法により試験管内（*in vitro*）で増幅させる。そして再び対応付け分子を形成させる。この操作（濃縮サイクル）を繰り返すことによって、解析対象に対して相互作用する対応付け分子が高度に濃縮されることとなる。これらの対応付け分子にはタンパク質をコードする核酸（遺伝子）が付加されているので、この塩基配列を解析することにより、このタンパク質部分を同定することが可能となるのであ

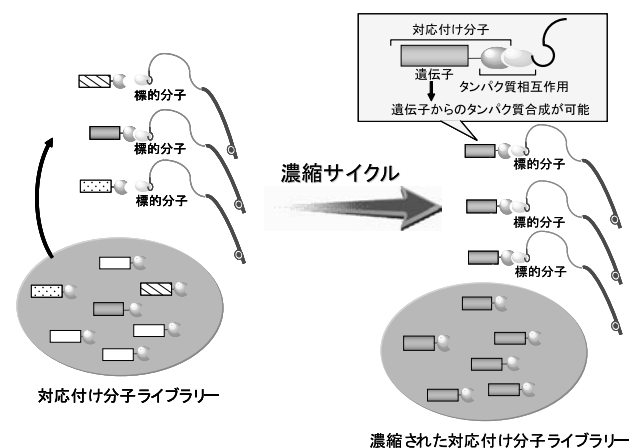


図2 対応付け分子の濃縮（概念図）

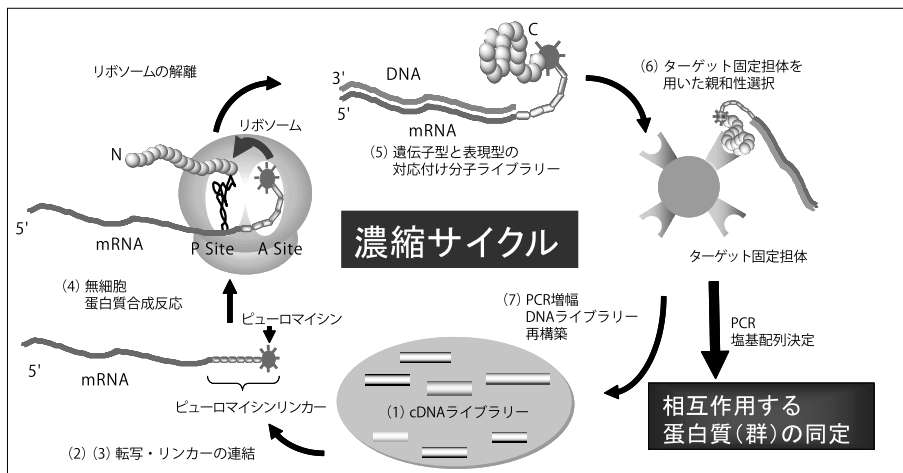


図3 CFPD法による濃縮サイクルのステップ

利用してPCR法による増幅を行う。この増幅産物を用いて(2)に戻り、同様の操作を繰り返す。

2.2 無細胞タンパク質ディスプレイ法の特徴

CFPD法で利用する対応付け分子の核酸部分は情報タグとして増幅が可能であり、濃縮サイクルの繰り返しにより、相互作用分子を

る。以下に、より具体的に本技術の濃縮サイクルに関してステップごとに説明する。(図3)

(1) cDNA ライブラリーの作製

ヒト組織由来等のmRNAライブラリーを用意し、ランダムプライマー法を用いて鋳型DNAを合成する。さらに*in vitro* 転写および蛋白合成反応に必要な核酸配列を付加する。

(2) *in vitro* 転写反応

SP6もしくはT7ポリメラーゼを利用し、*in vitro*にて(1)で作製した鋳型DNAよりmRNAを調製する。

(3) mRNAとピューロマイシンリンカーの結合

T4RNAリガーゼを用い、(2)で調製したmRNAの3'側にピューロマイシンリンカーを結合させる。

(4) 対応付け分子から成るライブラリーの作製

上記(3)で作製したものを無細胞タンパク質合成反応(ゾイジーン(株)小麦胚芽系)にかけると対応付け分子のライブラリーが形成される。

(5) 逆転写反応による核酸部分の二本鎖化

さらにこれを鋳型とした逆転写反応によりmRNA/cDNAの二本鎖核酸を形成させ、安定な対応付け分子から成るライブラリーにする。

(6) 標的物質による対応付け分子の単離操作

標的物質を固定したビーズに(5)のライブラリーを添加し、ビーズに結合した対応付け分子を回収する。

(7) 回収した対応付け分子の核酸部分の増幅

回収した対応付け分子の核酸部分(DNA)を

10万倍以上も濃縮が可能である。また他のディスプレイ法で使用される分子と比較し、分子サイズが小さくかつ安定である。さらに、CFPD方法では全ての操作を無細胞系で実施する。このため、核酸ライブラリーを生細胞へ導入する際に生じる形質転換効率の制限により、核酸ライブラリーのスケールが減少することが全く生じない。したがって、本技術では一度に大規模な分子数を有する多様な生物由来もしくは人工ランダムペプチドのライブラリー(約 10^{13} 分子~)を利用することができる。これは提示可能なタンパク質の多様性のスケールにおいて、同じ核酸-タンパク質対応付け技術であるファージディスプレイ法を大きく上回るレベルである。また無細胞系である特徴を生かし、細胞毒性を示す核酸やタンパク質のスクリーニング、さらには非天然アミノ酸導入などの蛋白工学的手法を取り入れることも可能である。なお、本技術はゾイジーン社の親会社である三菱化学(株)にて知的財産に関する権利が取得されている。

3 無細胞タンパク質ディスプレイ法の応用

医療産業におけるCFPD法の応用として、創薬の標的分子に相互作用するタンパク質の同定、薬剤標的タンパク質の解析、ヒト抗体分子の取得やその改変、抗体が認識する抗原タンパク質(抗原部位)の同定、さらには蛋白工学的手法として種々の機能性タンパク質やペプチドの改変が挙げられる。以下にその具体例について、我々が取得

している結果の一部を紹介する。(www.zoegene.co.jp 参照)

3.1 薬剤標的タンパク質解析への応用

免疫抑制剤FK506を対象とし、これと相互作用するタンパク質の解析を試みた。FK506はビオチンリンカーを導入してストレプトアビジンビーズに固定化し、本技術を用いてヒト組織由来mRNAライブラリーより対応付け分子のライブラリーを調製し、7~8回の濃縮サイクルを繰り返した。その結果、FK506と主に相互作用することが知られているFKBP12およびFKBP5が取得された。さらにこれらのFKBPファミリーと50%程度の相同性を有する新規なFKBP様タンパク質を2種類同定することにも成功しており、我々は新たな免疫抑制剤の標的分子として注目している。

3.2 タンパク質相互作用解析への応用

TGF β は肝硬変などの組織繊維化等に関与するタンパク質(サイトカイン)であり、そのシグナル経路に関与する分子は創薬の標的として広く研究されている。そこでこのシグナル経路のキーファクターとして働くSmad3に相互作用するタンパク質に対し、CFPD法を用いて解析した。Smad3を固定化した樹脂を利用し、4回の濃縮サイクルを繰り返した結果、Smad3と結合することが知られているSARA(Smad Anchor for Receptor Activation)を中心に、種々の転写因子、細胞周期に関与する因子など、Smad3と相互作用する新たな分子を同定することができた。取得されたSARAは、定量PCRにより元のmRNAライブラリーから約10万倍濃縮されていることが判った。これらの取得されたタンパク質の中には、このシグナル伝達系に関与するtype 1 serine/threonine protein phosphatase (PP1c)が含まれていた。このPP1cはSARAと相互作用することが知られていることから、CFPD法は直接に相互作用するタンパク質のみならず、間接的に相互作用するタンパク質も同定することが可能なユニークな技術であると考えている。

3.3 機能性ペプチド取得への応用

進化の過程においてタンパク質を構成するアミノ酸配列には、他の分子との相互作用をつかさどる様々なドメインペプチドが保持されていることが知られている。これらの中から標的分子を特異的に認識可能な低分子ペプチドを迅速に取得することができるならば、医療および診断領域等で頻繁に利用されている抗体分子など、高分子タンパク質を代替する新たな分子プローブとして利用可能となり、産業界における有用性は高いと考えられる。そこでIL6, TNF α などのサイトカイン、核内受容体として知られるPPAR γ を標的分子とし、種々のmRNAライブラリーよりこれらを特異的に認識する低分子ペプチドの取得をCFPD法を用いて試みた。より短鎖のペプチドをコードする鋳型DNAを調製するため、プライマー濃度を適切に調節したランダムプライマー法を用い、数十アミノ酸がコードされた鋳型DNAを合成し、濃縮サイクルを繰り返した結果、標的分子に対して特異的な相互作用やアンタゴニスト活性を示す短鎖のペプチドが取得された。このことから、本技術は抗体分子などを代替する新たな分子プローブの開発など、今後のペプチド工学に極めて有効な技術であると考えている。

<参考文献>

- 1) Ellington, A.D. et al. : Nature, 346, 818-822, 1990
- 2) Nemoto, N. et al. : FEBS Lett, 414, 405-408, 1997
- 3) Horisawa, K. et al. : Nucl. Acid. Res., 32 (21), e169, 2004

仲 大地 (なか だいじ)
技術士(生物工学部門), 理学博士

ソイジーン(株) 蛋白合成事業部 蛋白工学グループ グループマネージャー

