

新機能性核酸・タンパク質を生み出す コンビナトリアル・バイオエンジニアリング

阿部 洋・和田 章・伊藤 嘉浩*

コンビナトリアル・バイオエンジニアリングは、化学とバイオテクノロジーを融合した新しい手法として、これからの「ものづくり」になくはならない。ダーウィンの進化論の「突然変異」、「自然淘汰」、「増殖」のサイクルをそのまま対応させたプロセスを分子レベルで試験管内で行うことで、さまざまな新しい機能性核酸やタンパク質・ペプチドの合成が可能であることがわかってきた。無生物で増殖させることができる DNA を有効に使うことで、図1に示すような進化分子工学が可能となる。試験管内で行えるため、有機合成した非天然ヌクレオチドや非天然アミノ酸を組み込むことも可能になる。ここでは、これら手法を用いた機能性高分子創製の最前線を解説する。

核酸のインビトロセレクション

核酸の試験管内進化法 (*in vitro* selection あるいは systematic evolution of ligands by exponential enrichment; SELEX) は、ランダム配列の核酸ライブラリー（「突然変異」）から出発し、アフィニティーカラムによる選別（「淘汰」）をへ、「増殖」にあたる PCR による核酸の増幅を行うことにより、1 サイクルが完了する。このサイクルを繰り返すことにより、標的分子に高い結合能力を有する配列のみが生き残り、増殖することになる。本過程で得られる結合性の核酸分子は aptamer（アプタ

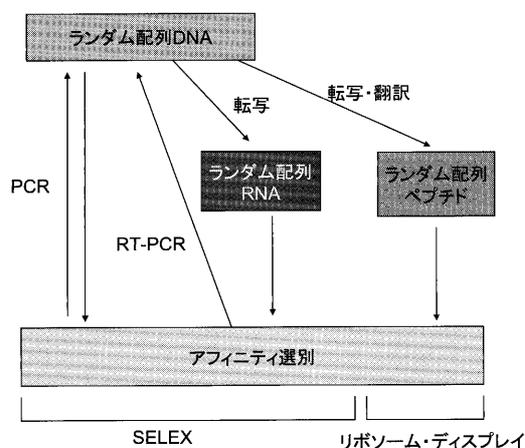


図1. 核酸とペプチドの進化分子工学

マー）と呼ばれる。現在までに、さまざまなタンパク質や低分子化合物に結合するアプタマーが得られている (<http://aptamer.icbm.utexas.edu/>)。

この試験管内進化法の選別のステップを工夫することにより、現在までに単に結合するだけに限らずさまざまな機能性分子が獲得されている^{1,2)}。その中でもとくに興味深いものが触媒機能をもつ核酸分子である。

触媒機能を有するオリゴ核酸を探索する方法には二つの方法がある。一つは間接法と呼ばれ、抗体触媒と同じように遷移状態アナログをターゲット分子として、これに結合する分子を得る方法である。たとえば、抗体触媒でも試された、平面状のポルフィリンが少し歪んだ構造をとるメチルメソポルフィリンを遷移状態アナログとして、これと結合する RNA や DNA が得られた。これらのメチルポルフィリン結合性核酸は、ポルフィリンに対するメタレーション反応を加速した¹⁾。また、コレステロールとパラニトロベンゼンアルコールのリン酸ジエステルを遷移状態アナログとして、獲得された RNA は、同基質の炭酸エステルの加水分解反応を触媒した³⁾。

もう一つの方法は直接法と呼ばれる。たとえば、基質をビオチンでラベル化して、ランダム配列の核酸分子ライブラリーと反応させる。ライブラリーの中で基質と自己触媒反応により結合する核酸配列はビオチンラベル化され、アビジン結合担体で回収される。この方法では、アミド結合やエステル結合形成反応、さらには Diels-Alder 反応を触媒するオリゴ核酸などが得られている。我々の研究室では、この直接法を用いて、中性環境下でのみ活性のあるリボザイムを酸性条件下で活性を持つように調整することに成功している¹⁾。

非天然核酸組み込み

天然ヌクレオチドは4種類に限られているが、新たに合成した非天然ヌクレオチドを用いて、進化分子工学により新しい機能性オリゴ核酸を合成することができる¹⁾。

非天然核酸を機能性高分子に組み込むには、二つの方法がある。一つは、すでに機能がある天然オリゴ核酸の一部を非天然核酸に置換する方法で、ポスト修飾法とい

* 著者紹介 (独) 理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室 (主任研究員) E-mail: y-ito@riken.jp

える。Vesterらは、DNAzymeに彼らが開発したLNA (LOCKed nucleic acid) 構造に置換し、安定性の高いLNAzymeを考案している⁴⁾。

もう一つは、非天然ヌクレオチドアナログをポリメラーゼの基質として、直接試験管内分子進化の過程に組み込む方法である。これまでも、さまざまなヌクレオチドアナログを用いて本手法が適用されてきた。たとえば、Ellingtonらは、蛍光基を導入したヌクレオチドを用いて類似の選別を行い、分析対象物を分子認識すると蛍光強度が変化するセンサーアプタマーを獲得した⁵⁾。非天然ヌクレオチドを導入した核酸触媒の最初の例としては、イミダゾール基を導入したヌクレオチドを用いた試験管内進化法で、Diels-Alder反応を触媒するリボザイムが調製された⁶⁾。これは、非天然ヌクレオチドを用いた進化分子工学の最初の例で、大きなインパクトを与えた。我々は、2'位に水酸基の代わりにアミノ基をもつポルフィリン・メタレーションを触媒するリボザイムをRNAの代わりに得て、過酸化水素の還元反応を触媒するペルオキシダーゼとして働くことを示した⁷⁾。

Ellingtonらは、最近、2'OMeリボヌクレオチドアナログを基質として効率よく鎖伸長できる変異型T7RNAポリメラーゼを開発した⁷⁾。さらに、Keefeらは、変異型T7RNAポリメラーゼを用いて、すべて2'-OMeRNA骨格からなるアプタマーを創出した⁸⁾。このアプタマーはVGEF (vascular endothelial growth factor) を標的としており、2'-OMeRNAの高い生体内安定性から有望な核酸医薬となり得る。今後、さまざまな非天然ヌクレオチドを含むオリゴ核酸ライブラリーが調製され、そこからの選別が行われるようになれば、これまで考えられなかった新しい機能性触媒も種々生まれてくる可能性がある。

タンパク質・ペプチドのインビトロセクション

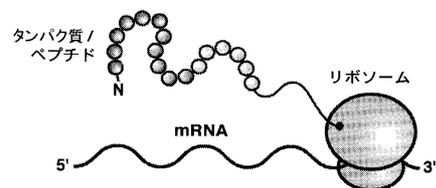
核酸のインビトロセクションは、PCRなどによる複製と増幅が可能であることから飛躍的に発展してきた。しかし、機能性タンパク質を選択する場合、この増幅法が適応できない。それゆえ、微量のタンパク質をいかにして回収し、どのようにアミノ酸配列を決定するかが大きな問題であった。そこで、表現型としてのタンパク質とその情報を記録している遺伝子型としてのmRNA/DNAを連結した複合体 (対応付け分子) を作製し、それらを選択実験に利用するという概念が生まれた。つまり、対応付け分子のタンパク質部位の機能により選択した後、その核酸部位を回収・解析することで、目的の機能性生体分子を同定するという手法である。これにより、

対応付け分子の作製と選択操作以外は、核酸の試験管内進化サイクルの操作をそのまま適応することができるようになった。

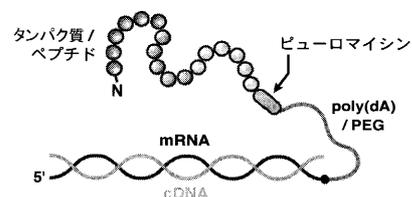
現在、この原理を基礎として開発された試験管内分子選択法⁹⁾として、リボソームディスプレイ法、mRNAディスプレイ/*in vitro* virus (IVV) 法、*in vitro* compartmentalization (IVC) 法が報告されている。これらの技術では、無細胞転写・翻訳系を採用しており、すべての実験操作が試験管内レベルで迅速に遂行できるように設計されている。

リボソームディスプレイ法 一般にリボソームは、タンパク質をコードするmRNA上を移動しながら翻訳を行い、終止コドンに出会うことで遊離し、翻訳は終了する。しかし、リボソームディスプレイ法では、mRNAの終止コドンを取り除くことでリボソームの遊離を抑制し、表現型と遺伝子型を結合させたタンパク質/ペプチド-リボソーム-mRNA対応付け分子を形成させる (図2-1)。そして、この対応付け分子に提示するタンパク質/ペプチドにランダム配列を導入したライブラリーを構築し、標的分子に対する結合性を条件にしてスクリーニングを行えば、目的の生体分子を選択することが可能となる。たとえば、Plückthum¹⁰⁾らは、超可変領域にラン

1. Ribosome display



2. mRNA display / *in vitro* virus (IVV)



3. *in vitro* compartmentalization (IVC)

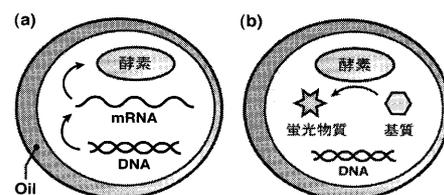


図2. 試験管内分子選択法における対応付け分子

特 集

ダム配列を挿入した一本鎖抗体scFvライブラリー(～10¹²種類)を作製し、各種抗原(インスリン/フルオレセイン/GCN4ペプチド)に対する親和性を指標にしたスクリーニング実験を行った。その結果、いずれの抗原においてもpMオーダーの解離定数を有する高親和性scFvの選択に成功した。

mRNAディスプレイ/*in vitro* virus (IVV) 法 これらの方法では、ピューロマイシンをmRNAの3'末端にpoly(dA)もしくはPEGリンカーを介して結合させた後、翻訳したタンパク質のC末端とピューロマイシンをリボソーム内にて反応させる。その結果、リボソームの解離により、表現型と遺伝子型が共有結合により連結したタンパク質-mRNA対応付け分子が形成される(図2-2)。さらに、高次構造を取りやすい一本鎖RNA部分を逆転写することにより、cDNA-mRNAの二本鎖核酸へと変換する。これにより、構造的剛直性の獲得と共にRNAアダプターの選択が抑制され、より信頼度の高い選択実験を行うことが可能となった。たとえば、Szostak¹¹⁾らは、80アミノ酸の完全なランダムペプチド配列(6×10¹²種類)のmRNAライブラリーから、新たなATP結合性タンパク質の選択に成功している。一方、柳川¹²⁾らは、IVV法をゲノムネットワーク解析に応用しており、マウスcDNAを元に作製したmRNAライブラリーから、Fosタンパク質と相互作用する既知および候補タンパク質を同定している。

***In vitro* compartmentalization (IVC) 法** この方法では、無細胞転写・翻訳に必要な因子と酵素をコードするDNAライブラリーをエマルジョン(w/o型)液滴内に閉じこめることで、表現型と遺伝子型を対応付けている(図2-3a)。つまり、1個のエマルジョン内(直径～2.6 μm)に1分子のDNAのみが存在するように調整されており、翻訳された酵素を完全に区画化された環境で機能させることができる。これにより、液滴内の基質に対する反応性を条件にして、より高い触媒機能を発現する酵素を選択することが可能となった。Griffiths^{9,13)}らは、基質から蛍光性物質を生成する反応とその反応を触媒する酵素(DNAメチルトランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼなど)のライブラリーを組み合わせたIVC選択システムを数多く構築している。ここでは、ライブラリーとしてのエマルジョンの調整→転写→翻訳→酵素反応(図2-3b)を行った後、FACS (fluorescence activated cell sorting)

によりエマルジョン(w/o/w型)を単離する。このとき、触媒機能を反映した蛍光量を基準にしてエマルジョンを分取するため、触媒活性が向上・進化した酵素のみを選択することが可能となる。

非天然タンパク質・ペプチドへ

最近では、非天然アミノ酸をランダムな位置に導入したタンパク質/ペプチドライブラリーの開発と選択実験への応用も検討されている。たとえば、宍戸・芳坂ら¹⁴⁾は、4塩基コドン法とmRNAディスプレイ法(図2-2)を組み合わせることで、非天然アミノ酸導入ペプチドを提示したmRNAライブラリー(1×10¹²種類)を作製した。そして、ストレプトアビジンに対する結合性を指標にしてスクリーニング実験を行ったところ、非天然アミノ酸としてベンゾイルフェニルアラニンを含む親和性ペプチドを選択することに成功した。

今後、新たな機能性非天然アミノ酸の合成と試験管内分子選択システムへの応用により、天然アミノ酸では獲得し得なかった性質・機能(蛍光性、光感受性、化学反応性など)を有する人工タンパク質の創出が可能となる。そして、上記の天然・非天然核酸/アミノ酸を利用したコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの更なる進展は、高感度バイオセンサー・ナノ抗体・人工核酸医薬などをテーラーメイドに創製する新たなバイオ技術の開発において、重要な役割を果たすであろう。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩：化学工業，**53**, 430 (2002).
- 2) 伊藤嘉浩：ナノバイオテクノロジーの最前線(植田充美)，p.78, シーエムシー出版(2003).
- 3) Chun, S. M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10844 (1999).
- 4) Jhaveri, S. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **18**, 1293 (2000).
- 5) Tarasow, T. W. *et al.*: *Nature*, **389**, 54 (2000).
- 6) Vester, B. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13682 (2002).
- 7) Chelliserrykattil, J. *et al.*: *Nature Biotechnol.*, **22**, 1155 (2004).
- 8) Burmeister, P. E. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 25 (2005).
- 9) Leemhuis, H. *et al.*: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 472 (2005).
- 10) Lipovsek, D. and Plückthun, A.: *J. Immun. Methods*, **290**, 51 (2004).
- 11) Keefe, A. H. and Szostak, J. W.: *Nature*, **410**, 715 (2001).
- 12) Miyamoto-Sato, E. *et al.*: *Genome Res.*, **15**, 710 (2005).
- 13) Mastrobattista, E. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 1291 (2005).
- 14) Muranaka, N. *et al.*: *Nucleic Acid Res.*, **34**, e7 (2006).