3P101

N末端側にリンカーを持つ in vitro virus の開発

○上野 真吾、深石 圭、新井 秀直、鈴木 美穂、伏見 譲 (埼玉大・工)

進化蛋白質工学において無細胞翻訳系を用いる in vitro selection は、大きな多様性が確保でき、細胞毒性を持つ蛋白質の進化も可能である。我々は蛋白質の in vitro selection 手法として、種々の in vitro virus の開発を試みてきた。これ以外にも、ribosome display を筆頭に、蛋白質の in vitro selection 手法が数多く開発されている。しかしながら、それらの殆どは提示するペプチドの C 末端側に遺伝子型分子を結合させる手法である。従って機能部位が C 末端側に存在したり、フリーの C 末端を機能上要求する蛋白質の進化には、N 末端側に遺伝子型分子を結合させる手法の開発が必要である。実際、数例報告されているが、ここでは、新たな手法を考案したので報告する。

mRNA の開始コドンから数コドン下流に終止コドンを配置し、サブプレッサー tRNA を用いる非天然アミノ酸導入法を応用して、ペプチドの N 末端側に遺伝子型分子である mRNA を結合させる手法を新たに開発している。この手法ではペプチドの C 末端側がフリーになる。また、サブプレッサー tRNA が終止コドンに取り込まれない限り完全長のペプチドは生成しない。その為、従来の手法における、遺伝子型分子と結合したペプチドと、結合していないフリーペプチドの競合は、本手法では排除できる。本発表ではこの新手法の開発経過について報告する。

S.Ueno, K.Hukaisi, H.Arai, M.Suzuki, Y.Husimi : Linkage between the N-terminus of a peptide and its encoding mRNA.

3P103

In vitro virus を用いた固相上での遺伝子発現

山口 淳一^{1,2,4}、佐々木 亨³、白鳥 美和³、船津 高志²、○根本 直人^{1,3,4} (¹ 埼玉バイオ/埼玉県中小企業振興公社、² 早稲田大・生命理工、³ ジェンコム、⁴ バイオビジョン・キャピタル)

近年、進化分子工学における遺伝子型と表現型対応付け技術の発展は著しく、特に核酸とそれにコードされたタンパク質の連結技術には目を見張るものがある。しかし、実用上いくつかの技術的課題があることもわかっている。例えば、mRNA とそれをコードするタンパク質を無細胞翻訳系の中で連結する In vitro virus (IVV) 法の場合、(1) mRNA の不安定性 (2) mRNA の 3 次構造による非特異的相互作用、がある。これらは翻訳後速やかに逆転写することで同時に解決できるが、翻訳系中では mRNA 上の複数のリボゾームの存在と逆転写用プライマー投入の必要から必ずしも逆転写が容易ではない。そのため、RNA-タンパク質連結体を翻訳系からできるだけ早く取り出し逆転写用バッファー中で速やかに DNA 化し RNA/DNA-タンパク質連結体にすることが望ましい。筆者らが開発したビオチン・逆転写プライマー付 IVV 用スぺーサーはこれらの要求に十分に応えることを確認した。今回はこのスぺーサーを用いて mRNA をビーズに固定後、無細胞翻訳系を加えタンパク質合成を行った。合成されたタンパク質はスぺーサーに付いたビュロマイシシを介してビーズに固定化される。具体的には緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードした mRNA をビオチン付 IVV 用スぺーサーでストレプトアビジン・ビーズに固定化した後、ウサギ赤血球無細胞翻訳系を加えビーズ上で GFP が蛍光を発するのを確認した。これはタンパク質をポリエチレングリコール (PEG) のような高分子を介して自由度を持たせた形で固定化する方法を提供するだけでなく、保存性が問題となるプロテインチップを mRNA チップという形で保存し、使用時にプロテイン化することも可能にする。今後、ナノテクノロジー等と組み合わせプロテオミックスを中心に様々な展開が可能と考えている。

J. Yamaguchi, T. Sasaki, M. Siratori, T. Funatsu and N. Nemoto : Gene expression on bead using in vitro virus

3P102

Protein synthesis on bead using in vitro virus: Can immobilized mRNA enhance the translation and folding of protein?

○Biyani Manish¹、伏見 譲^{1,2}、根本 直人^{1,3} (¹ 埼玉バイオ / 埼玉県中小企業振興公社、² 埼玉大・工、³ 産総研・ベンチャー開発戦略研究センター)

The *in vitro* evolution is current of great interest for discovering highly functional bio-molecules and has been greatly aided by genotype-phenotype linking technologies (e.g. in vitro virus (IVV); mRNA display). However, the success is tightly depending on the controlled handling. For example, protein folding which is crucial to the function of protein requires controlled handling during *in vitro* expression. Removal of interaction between growing peptides may enhance folding efficiency, and interactions with molecular chaperones determine folding rates. Thus, in order to exploit such effects, we are developing a new approach of 'translation and selection on beads' by taking advantage of the immobilization and the affinity between biotin and streptavidin (StAV). In this study, we regulated the translation and folding of aldehyde reductase (ALR, an enzyme reduces a wide variety of aldehydes to their corresponding alcohols using NADPH as a coenzyme and implicated in a variety of diabetic complications as well as in general detoxification) by immobilizing the biotinylated RNA template on StAV-coated paramagnetic beads through the formation of IVV, which yielded an increase of more than two fold enzymatic activity of ALR. We believe that efforts in this direction can lead to significant advances in *in vitro* evolution, in general, and protein folding, enzyme activity in particular. These advances would contribute also in proteomics researches.

Manish Biyani, Yuzuru Husimi and Naoto Nemoto : Protein synthesis on bead using in vitro virus: Can immobilized mRNA enhance the translation and folding of protein?

3P104

コード付きペプチドライブラリー (ペプチド *in-vitro-virus*) の作成とプロテアーゼ活性阻害ペプチドの進化的創生

○北村 幸一郎¹、木下 保則²、吉田 暁也²、高橋 陽子¹、根本 直人^{1,3}、山本 健二^{1,4}、西垣 功一^{1,2} (¹ 埼玉バイオ / 埼玉県中小企業振興公社、² 埼玉大・工、³ 産総研・ベンチャー開発戦略研究センター、⁴ 九大院・歯)

プロテアーゼはガンやアルツハイマーなどさまざまな疾病に関与していることが知られている。本研究ではプロテアーゼ阻害活性を持つペプチドの進化的創生のために、まず YLBS 法により 20 種類のアミノ酸コドンを任意の配列に連結することでオクタペプチドに対応する DNA ライブラリーを作製し、次にこの DNA ライブラリーを遺伝子型と表現型とを対応させる戦略 IVV (*in-vitro-virus*) に基づく発現系ベクターに組み込み、転写、翻訳などの一連の操作の上でペプチドを提示した IVV ライブラリーを構築した。プロテアーゼと 1、結合親和性に基づいたスクリーニングを行い、さらに 2、阻害活性を持つペプチドを迅速淘汰するために、新たに SF リンク法 (候補分子がプロテアーゼに結合するのみではなく、正しく活性を阻害することに基づいて淘汰するための方式) の導入を行い、最終的に阻害活性を持つペプチドアダプターを淘汰した。ここで確立した方法及びライブラリーはプロテアーゼ阻害剤の発見一般に通用する有用なものである。

Koichiro Kitamura, Yasunori Kinoshita, Chuya Yoshida, Youko Takahashi, Naoto Nemoto, Kenji Yamamoto and Koichi Nishigaki : Construction of a coded peptide library (pept-*in-vitro-virus*) and molecular evolution of protease inhibitor peptides.