

# リボソームディスプレイに適した無細胞蛋白質合成系の開発

○ 金森 崇<sup>1,2</sup>、村上 朋重<sup>1</sup>、中村 美紀子<sup>1,2</sup>、対比地 久美子<sup>1,2</sup>、加藤 静恵<sup>1,2</sup>、速水 友紀<sup>2</sup>、  
古城 周久<sup>2</sup>、上田 卓也<sup>1</sup> (1東大院・新領域、2ジーンフロンティア(株))

## Development of cell-free protein synthesis system suitable for ribosome display

○ Takashi Kanamori<sup>1,2</sup>, Tomoe Murakami<sup>1</sup>, Mikiko Nakamura<sup>1,2</sup>, Kumiko Tsuihiji<sup>1,2</sup>, Shizue Kato<sup>1,2</sup>, Yuki Hayami<sup>2</sup>,  
Kanehisa Kojoh<sup>2</sup> and Takuya Ueda<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Grad. Sch. of Frontier Sci., Univ. of Tokyo, <sup>2</sup>GeneFrontier Corp.)

### 要旨

近年、非常に大きな遺伝子ライブラリから目的の機能を持つ蛋白質の遺伝情報を高精度で迅速に選択する技術として、無細胞蛋白質合成系を利用するリボソームディスプレイ(RD)が開発された。RDは、蛋白質合成反応液中でmRNA-リボソーム-新生蛋白質の三者複合体を形成させた後、提示した蛋白質の特性により、その遺伝子を選択する技術である。RDを用いた選択効率は、使用する無細胞蛋白質合成系によって大きく左右される。当初、使用されていた大腸菌S30抽出液には、RNaseなど反応を阻害する因子が多量に含まれており、効率が非常に低かった。我々の研究室において開発されたPURE systemを使用することで、その効率は格段に上昇したが、非特異的な回収が多いなどの問題点が残されていた。そこで、我々は、選択効率を改善するために、PURE systemの改良を行った。特に、構成因子の精製時に混入してくるリボ多糖の低減を指標にして精製方法の見直しを行った。その結果、従来のPURE systemに比べ、リボ多糖の混入量を3桁減少させた反応液の開発に成功した。また、同時にRNaseなどの他の夾雑物の混入も減少させることができた。実際に、開発した反応液を使用してRDを行うと、従来のPURE systemを使用した場合と比較して選択効率が10倍以上改善された。この結果は、今回開発した新しい無細胞蛋白質合成系を使用することにより、RDがより実用的な選択系になることを示すものである。

### 2. 新規PURE system

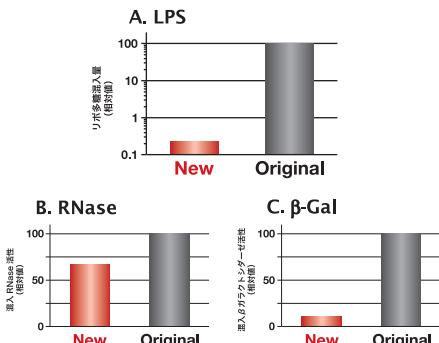


Figure 2-1.  
新規PURE system反応液に混入している夾雑物量は、従来の反応液より低減している

#### A. リボ多糖 (LPS)、B. RNase、C. β-ガラクトシダーゼ (β-Gal)

従来のPURE system反応液に含まれている夾雫物のうち、代表的な3種類の夾雫物の混入量を、それぞれ常法により測定した。従来の反応液に混入している夾雫物量を100とした相対値で示す。

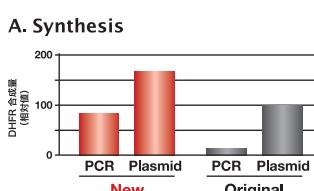


Figure 2-2.

#### 新規PURE system反応液を用いた蛋白質合成

##### A. 新規PURE systemは蛋白質合成活性が上昇している

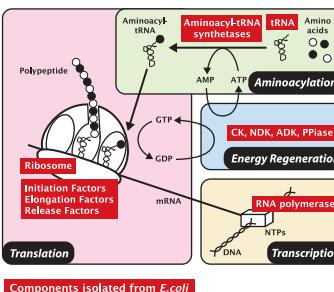
従来(Original)、新規(New)のPURE system反応液を用いてDHFRを合成した。鏡型DNAとして、PCR産物またはプラズミドを添加して、37°Cで4時間反応後、SDS-PAGEにかけ、SyproOrangeでリボソームを染色した。合成されたDHFRのバンドを定量し、従来の反応液を使用してプラズミドから合成した場合を100とした相対値で示す。

##### B. 新規PURE systemは、合成されたHistag付蛋白質を精製できる

新規PURE systemを用いてGFP-Histagを合成後、Ni磁ビーズで精製した。合成分(Syn)、未吸着画分(FT)、洗浄画分(Wash)、溶出画分(E)をSDS-PAGEにかけ、SyproOrangeで染色した。精製したGFP-Histagのバンドを○で示す。

### 1. PURE system (再構成型無細胞蛋白質合成系)

転写・翻訳反応に必要なりボソームなどの構成因子を個別に精製した後、再構成した無細胞蛋白質合成系



特長  
蛋白質合成を阻害する因子の混入が少ない  
反応液の構成の調節が容易

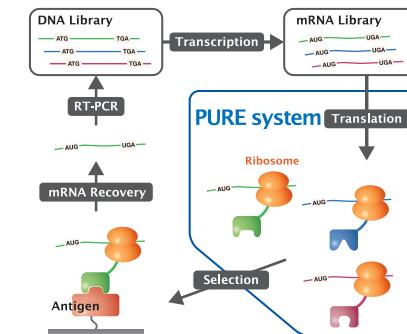
利用  
蛋白質調製  
SS結合含有蛋白質  
膜蛋白質  
非天然アミノ酸含有蛋白質  
in vitro ディスプレイ  
リボソームディスプレイ  
プロテオーム解析

精製が不十分な構成因子由來の夾雫物が含まれる  
純度を向上させた新規PURE systemの開発

	New	Original
Proteins	None	Histag
Tag	3	1
Number of column	+	-
Wash with detergent	+	-
Ribosome	Wash with detergent	+
tRNA	Wash with detergent	+

(Original; Shimizu et al. (2005) Methods, vol.36, p.299)

### 3. PURE Ribosome Display (PURE RD)



#### RNF8-based library

RNF8 (FHA domain)  
MW: 18 kDa  
E3 ubiquitin ligase  
β sandwich structure  
4 loops (NNS)



mRNA (RNF8-based library;  $1 \times 10^{13}$  molecules + RNF8-based Erk2 binder;  $1 \times 10^6$  molecules)

+ PURE system (Original or New)

↓ RD complex formation (37°C, 30 min)

Selection x 3 rounds

Ag: +/- biotinylated Erk2

Beads: Streptavidin-magnetic beads

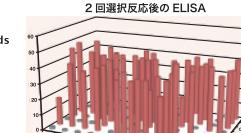
mRNA

↓ cDNA

↓ cloning

↓ ELISA

新規PURE systemを使用したRDで2回選択反応後のELISA

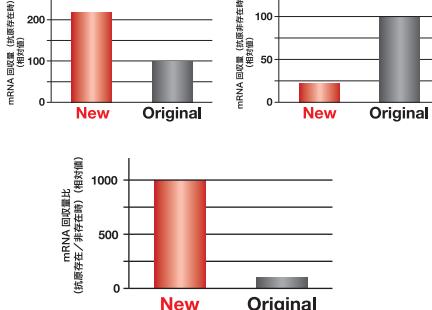


Round	New	Original
2nd	53.7% (51/95)	0.0% (0/95)
3rd	80.0% (76/95)	29.5% (28/95)

#### Figure 3-2.

新規PURE system反応液を使用したRDでは、2回の選択反応で、陽性クローニングが得られる。

陽性コントロールを添加したライブラリを用いてRDを行ない、回収されたmRNAからクローニングした。2回目、3回目の選択反応後、それぞれ95クローニングの抗原に対する結合をELISAにより検証した。



#### Figure 3-3.

新規PURE system反応液を使用したRDでは、抗原特異的な結合が増加し、抗原非特異的な結合が減少する。

- A. 抗原特異的なmRNAの回収量の比較
- B. 抗原非特異的なmRNAの回収量の比較
- C. 抗原特異的/非特異的なmRNAの回収量の比較

陽性コントロールを用いて、RDのモデル実験を行ない、回収されたmRNA量をreal-time PCRで定量した。従来の反応液を用いた場合の量を100とした場合の相対値で示す。

Table 3-3.  
PURE systemと大腸菌抽出液を使用したRDの比較

	PURE system	E. coli	
	New	Original	S30 extract
Temperature at Selection	4-25°C	4-25°C	4°C
RD complex recovery rate	10-30%	2.5%	0.01-0.2%
Enrichment / round	100,000	1,000-10,000	20-250

### まとめ

- 構成因子の調製方法を見直すことにより、従来のPURE systemよりも高純度な反応液を調製した。
- 新規PURE system反応液を使用することで、RDの選択効率が、従来のPURE systemの場合に対して10倍以上増大した。