

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間健康科学)	氏名	東 克暁
論文題目	Construction of a T7 phage random peptide library by combining seamless cloning with <i>in vitro</i> translation (seamless cloningと <i>in vitro</i> translationの組み合わせによるT7ファージランダムペプチドライブラリーの構築)		
(論文内容の要旨) ファージディスプレイ法は、バクテリオファージのゲノムDNA上に任意の配列を組み込むことで、対応するペプチドやタンパク質をファージ表面に提示できる手法である。膨大な多様性を持つライブラリーを用いることで標的へ結合する分子を迅速に探索することができ、疾患の診断薬や治療薬の開発に繋がる様々な機能性分子が獲得されている重要な技術である。この手法で用いられるファージの一つであるT7ファージは、操作が迅速で簡便であることや提示分子のランダム配列の偏りが低いこと等の利点がある一方で、ライブラリーの多様性が低いことが課題とされている。一般的に、スクリーニングの成否はライブラリーの質に大きく依存し、ライブラリー中の分子の多様性の高さや偏りの小ささは重要な要素である。従来のT7ファージのライブラリーはランダム領域を含むゲノムDNAとファージの構成タンパク質抽出物 (Packaging Extract) とを混合することで作製されてきた。この反応で得られるファージ数が限られていることが多様性を制限する要因であった。 一方で、モノクローナルなファージについては、従来の手法以外にも <i>in vitro</i> transcription-translation (TXTL) システムを用いて作製する手法が報告されている。この手法では大腸菌抽出物を主成分とした反応溶液とファージのゲノムDNAとを混合することでファージ粒子が作製される。しかし、この手法が、多様性の大きさと偏りの低さを求められるライブラリーに応用された報告はない。そこで本研究では、まず、ファージのゲノムDNAを用いて、Packaging ExtractとTXTLとにおける独立したファージの作製効率の比較を行った。その結果、TXTLでは、Packaging Extractの100倍以上の効率でファージを作製できることが明らかとなった。 この手法をライブラリー作製に応用することでT7ファージライブラリーが持つ多様性の低さという欠点を克服できると考え、次にペプチド提示ファージライブラリーの作製を目指した。従来のライブラリーのゲノムDNAは制限酵素とリガーゼを用いて調製されており、ランダム領域内に制限酵素の認識配列が存在する場合、その分の多様性が失われる。そこで、新たにゲノムDNAの作製にはseamless cloningを採用した。ランダム領域を含むプライマーを用いたPCRによってライブラリーゲノムDNAの断片を調製し、seamless cloningによって全長を作製した。作製されたゲノムDNAに対してTXTL反応を行うことで従来よりも大きな多様性を持つライブラリーを作製することができた。また、ライブラリー中のランダム領域を次世代シーケンサーで解析することで提示分子の配列の偏りが小さいことが示された。最後に、作製されたライブラリーの性能評価を目的として、エピトープが既知 (DYKxxD) である抗FLAG抗体に対するスクリーニングを行った。6ラウンドを終えたファージプール中の提示分子の配列を調べたところ、既知のエピトープと完全に一致する配列を得ることができた。以上より、本研究では、seamless cloningとTXTLシステムを用いて高い多様性と小さい偏りを持つT7ファージライブラリーの構築方法の開発に成功し、抗体に対するスクリーニングによりエピトープ配列を同定できると示された。本研究ではペプチド提示ライブラリーを作製したが、この手法はcDNAや抗体等の提示系にも応用可能であり、幅広く機能性分子の獲得に寄与できると期待される。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、シームレスクローニングと無細胞翻訳系を組み合わせた新規手法により、ペプチド提示T7ファージライブラリーを構築した研究である。ファージディスプレイ法はバクテリオファージの遺伝子操作により様々な分子をファージ表面に提示できる手法であり、膨大な多様性のライブラリーから標的結合分子を探索することができる。従来法で作製されたT7ファージライブラリーは、多様性を確保しにくいという課題があった。

申請者は、多様性を制限するファージ産生ステップのメカニズムに着目し、無細胞翻訳系を導入するという新規手法を開発した。その結果、従来の100倍程度の多様性を持つライブラリーを作製した。また、ライブラリーDNAの作製ではシームレスクローニングの導入により、従来の制限酵素とリガーゼによる課題点を改善した。作製したライブラリーの性能評価として、提示分子に偏りがなく、ゲノム末端の欠損がないこと、そして、既存ライブラリーでは達成できなかった抗体のエピトープ探索を行い、新規ライブラリーが実用に足るものであることを示した。

また、申請者は、ペプチドライブラリー以外にもVHHライブラリーやcDNAライブラリーを作製し、本研究の成果の幅広い分野への貢献が期待できることも示した。

以上の研究は、ファージディスプレイ法の根本技術の改善に貢献し、ペプチド探索、抗体探索、自己抗原探索等の多様な分野に寄与するところが大きい。したがって、本論文は博士 (人間健康科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、2024年1月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公表可能日： 年 月 日以降