

インタビュー

瀧 真清 先生 (電気通信大学)

福永圭佑 先生 (北陸先端科学技術大学院大学)

機能性人工分子創製技術:10BASE_d-T法

FG beads® 冬のWキャンペーン

新商品情報



機能性人工分子創製技術: 10BASE_d-T法

瀧 真清 准教授(電気通信大学)、福永 圭佑 博士(北陸先端科学技術大学院大学)

有機合成とファージディスプレイ法を組み合わせた、革新的な機能性人工分子の創製技術: 10BASE_d-T法を開発した瀧先生、福永先生に、がんを始めとした様々な診断への応用と、FG beads®およびTarget Angler® 8の関わりについてお聞きしました。

はじめに

ファージディスプレイ法とは？

遺伝子工学を利用してファージの外殻タンパク質にペプチドまたはタンパク質のライブラリーを提示させ、標的物質と相互作用を持つファージをスクリーニングする手法。スクリーニングにより選択されたファージの遺伝子情報からアミノ酸配列を特定し、その配列を持つペプチドまたはタンパク質は、標的物質に強い相互作用を持つものとして診断薬や抗体医薬などに応用される¹⁾。

人工分子とタンパク質間の相互作用を作り出す

人工分子を特定のタンパク質に対して特異的に相互作用を持たせることができれば、がん関連タンパク質などの疾患マーカーの検出技術などに革新的な効果が期待できます。例えば、蛍光分子やPETプローブといった人工分子でそれが可能となれば、これら分子を添加するだけで、その疾患マーカーを特異的に検出できるようになります。これまでの技術では、分子デザインソフト等により、人工分子が標的タンパク質と特異的に相互作用する様に合理的に設計・合成する手法が用いられてきましたが、この手法では期待通りの物性を持つものを作ることは極めて難しく、ほとんどが不完全なものとなってしまいます。

そこで、人工分子の全構造を自分で設計するのではなく、相互作用を持たせたい人工分子(例えば蛍光分子)の構造はそのままに、そこにオリゴペプチドを結合させた構造全体を進化させることを考えました。人工分子としてはたった1つの構造しか持ちませんが、ランダムなアミノ酸で構成される、約10億通りものオリゴペプチドと結合させれば、いくつかの「特別なもの」、つまり標的のタンパク質と特異的な相互作用を持つものが生まれることが期待できます。そして、膨大な数の人工分子-ペプチド結合体の中から、「特別なもの」を見つけ出すには、ライブラ

リーの作製とその後のスクリーニングが一連の実験で可能であるファージディスプレイ法が応用可能であることを見出し²⁾、有機合成とファージディスプレイ法を組み合わせた、人工分子-ペプチド結合体ライブラリーの作製技術: 10BASE_d-T法を開発しました。

拡張版ファージディスプレイ: 10BASE_d-T法とは？

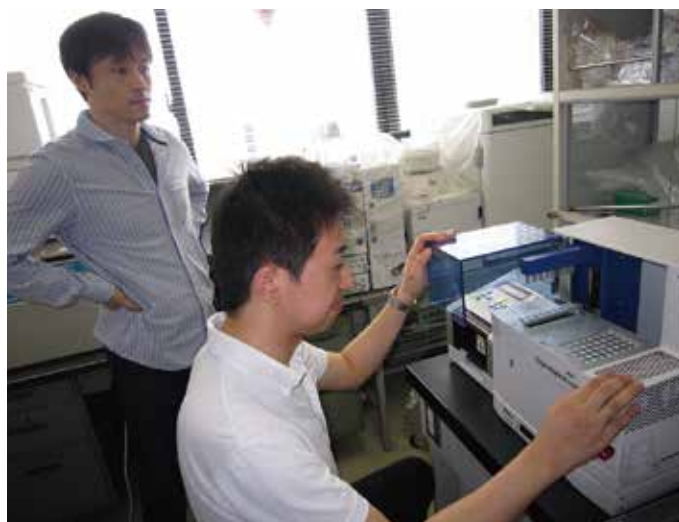
10BASE_d-T法は、「Gp10 based thioetherification (Gp10 タンパク質を利用したチオエーテル化)」の略称であり、T7ファージのgp10タンパク質に提示させたオリゴペプチドと人工分子を、位置特異的に簡便に結合させる技術です。T7ファージは頭部と尾部を構成するタンパク質の外側にSH基が露出していないため、ファージに提示させるオリゴペプチドにシステイン残基を1つ以上導入しておけば、還元剤の存在下でチオール反応基を持った人工分子(アルキル化剤)を加えるだけで、非特異的な反応を起こすことなく狙った位置で人工分子とペプチドを結合させることができます²⁾。その後は、通常のファージディスプレイ法と同様に、人工分子-ペプチド結合体のライブラリーの中から標的タンパク質と特異的に相互作用するものをスクリーニングします。従来のファージディスプレイ法では、スクリーニングにより得られるペプチドまたはタンパク質は、標的タンパク質に対して「特異的に

相互作用する」という機能しか持たないため、例えば標的タンパク質の検出を行う場合は、得られたペプチドまたはタンパク質に対し、事前に蛍光分子を結合させたり、あるいは追加操作として標識物質（二次抗体など）の添加を行う必要があります。ただ、前者の場合では蛍光分子を結合させることにより標的タンパク質に対する親和性が落ちたり、後者では操作と時間が増えてしまいます。しかし、10BASE_d-T法の場合は、その人工分子が蛍光分子であれば、既に蛍光分子がペプチドと結合した状態の「蛍光分子-ペプチド結合体」のライブラリーから、標的タンパク質に対して特異的に相互作用するものをスクリーニングすることができ、得られたものがそのまま「特異的な相互作用を持ち、かつ、蛍光により検出できる」という性質を持つため、上記2つの問題は生じません。これは、ペプチドは相互作用を生むための脇役であり、人工分子が主役である10BASE_d-T法ならではの大きな長所です。この技術により、「どのような人工分子についても、その分子機能はそのままに、標的がどのようなタンパク質であっても特異的に相互作用する機能を付加する」ことが可能になると考えています。

10BASE_d-T法とスクリーニングの実例

これまでに、10BASE_d-T法により作製した「サリチル酸-ペプチド結合体」のライブラリーから、ストレプトアビジンに特異的に相互作用するものを、また、「クラウンエーテル-ペプチド結合体」のライブラリーから、Hsp90 (Heat shock protein90) というがん関連タンパク質に特異的に相互作用するもののスクリーニングに成功しています³⁾⁴⁾。ここで、これら例を元に、10BASE_d-T法によるライブラリーの作製と、その後のスクリーニングの実際について説明します。まず、10BASE_d-T法により、ファージが提示するオリゴペプチドとサリチル酸またはクラウンエーテル前駆体とを結合させ、ライブラリーを作製します。次に、標的とするタンパク質（ストレプトアビジンまたはHsp90）を粒子担体に固相化し、先に作製したライブラリー溶液と反応させます。反応後、洗浄操作により非特異的なファージを取り除き、最後に、粒子担体に溶出液を加え、特異性が高いファージを回収します。回収したファージを培養し、同様の実験工程を繰り返すことにより、特異性が高いものが濃縮されていきます。

スクリーニングにおいては、非特異的なファージを取り除き、ファージをある程度のクローン数に収束させるための洗浄操作が重要となります。ファージディスプレイ法は一般に非特異的吸着があり、多くの回数の洗浄操作を行う必要があるため、担体の選択と操作の個人差



●Target Angler® 8を操作する福永先生



●10BASE_d-T法について語る瀧先生

の問題が実験系を構築する際のポイントとなります。そこで、非特異的吸着が少ないという特徴を持つFG beads®と、操作の個人差解消と実験の効率化が可能であるスクリーニング自動化装置、Target Angler® 8を実験で使用したところ、効率的に良い結果を出すことができました。FG beads®の表面を囲っているポリGMAと、粒子径が小さく分散性が高いという性質が、非特異的なファージの吸着を抑え、洗浄効果の増加に寄与しているものと思います。また、Target Angler® 8は温度環境の制御、溶液の分注、ビーズの攪拌による洗浄、磁気分離などの操作を常に再現性良く行ってくれるため、確かな考察の元で条件検討を進めることができました。スクリーニングの作業は洗浄操作の繰り返しを中心であり、毎日の作業がルーチン気味になってしましますが、装置にルーチン作業を任せることにより、より有効に時間を使うことができ、効率的に研究を行うことができたと感じています。

今後の取組み

10BASE_d-T法による機能性人工分子の創製は、疾患マーカーの検出に応用していこうと考えています。PETプローブなどの様々な人工分子での応用が可能ですが、現在特に注目しているものは、目的タンパク質への特異的な相互作用を持ち、かつ、結合前と結合後で色が変わる機能を持った人工分子です。この物性を私たちは「光変調性」と呼んでいます。例えば、血液中の疾患マーカーの存在有無を、特別な機器を用いなくても色の変化により誰でも分かりやすく判断できるようになり、迅速な判断が必要である現場での診断に貢献できるのではないかと考えています。

References

- 1) K. Fukunaga et al., J. Nucl. Acids, **2012**, Article ID:295719 (2012).
- 2) K. Fukunaga et al., Mol. Biosyst., **9**, 2988 (2013).
- 3) Y. Tokunaga et al., Molecules, **19**, 2481 (2014).
- 4) K. Fukunaga et al., Chem. Commun., **50**, 3921 (2014).

□経歴

瀧 真清 (たき ますみ)

1998年 群馬大学 大学院工学研究科 博士課程修了

2003年 岡山大学 工学部 助手

2007年～2008年 カリフォルニア工科大 (Caltech) 生物科 客員研究員

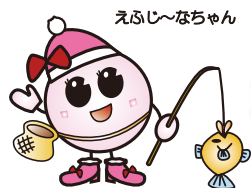
2011年 電気通信大学 大学院情報理工学研究科 准教授、現在に至る

福永 圭佑 (ふくなが けいすけ)

2012年 電気通信大学 大学院情報理工学研究科 産学官連携研究員

2014年 博士(工学)取得(電気通信大学)

2014年 北陸先端科学技術大学院大学 博士研究員、現在に至る



冬の大Wキャンペーン



期 間：2015年12月1日～2016年1月31日まで

※当キャンペーンは日本国内のみが対象エリアとなります。

標的タンパク質がキレイにとれる

機能性ナノ磁性微粒子

FG beads®

半額



商品特徴

- 高純度 ● 高回収率 ● 有機溶媒耐性 ●

FS beads、FF beadsはキャンペーン対象外です。

FG beads®を同時購入された方を対象に



磁石スタンドが

希望小売価格 80,000円 ▶ 56,000円

30% OFF

＜形式：TA4899N12＞

新商品情報

FG beads®用バッファー販売開始しました

当社の実験プロトコールに対応したバッファーの販売を始めました。
FG beads®を使用した実験がすぐ始められます！



製品外観

蛍光ビーズに新ラインナップ

蛍光を封入したFS beadsとFF beadsにProtein Gビーズとストレプトアビジンビーズが仲間入り！
イムノアッセイや免疫染色など幅広いアプリケーションにお使いいただけます。

編集後記

特定のタンパク質と親和性(相互作用)を持つ物質の作製法として、ファージディスプレイ法がありますが、瀧先生と福永先生が開発した10BASE_G-T法により作製される機能性人工分子も新たな選択肢になっていくのではないのでしょうか。ファージのスクリーニング工程ではFG beads®とTarget Angler® 8が活躍しています。非特異的吸着や作業時間の長さでお悩みの方は、是非ご検討ください。
当社ではより良い情報をお届けするため、皆様のご意見・ご感想をお待ちしています。
ご意見・ご感想はこちらまで ▶ FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp

Tamagawa 多摩川精機株式会社

【技術的なお問い合わせ】

多摩川精機株式会社 バイオロニクス研究所
〒395-8515 長野県飯田市大休1879番地
FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp
TEL (0265) 21-0501 (平日9:00~17:00)
FAX (0265) 21-1896

【ご注文・販売に関するお問い合わせ】

多摩川精機販売株式会社

バイオ営業部 TEL (0265) 21-0501 FAX (0265) 21-1896
北関東営業所 TEL (048) 833-0733 FAX (048) 833-0766
福岡営業所 TEL (092) 437-5566 FAX (092) 437-5533

<http://www.tamagawa-seiki.co.jp>

<http://www.magneticnanoparticle.jp>

販売店