

審査の結果の要旨

氏名 ラジクマール スバシニ

マイクロアレイは、生体分子の機能解析や相互作用解析の超並列化を可能にする重要なプラットフォーム技術である。既に、DNA マイクロアレイは核酸解析用ツールとして普及が進んでいる。一方で、ペプチド、タンパク質など DNA 以外の生体分子を集積する技術には多くの課題が残されており、当初、マイクロアレイに期待されたイノベーションは未だ部分的な達成に留まっている。本論文は、このような背景の下、同一スポットにタンパク質とその遺伝情報を保持する mRNA が共固定することが可能な新規の生体分子マイクロアレイ、すなわち、リボソームディスプレイ (RD) マイクロアレイを提案するとともに、その作製技術の研究開発を行い、タンパク質機能の高効率スクリーニングへの適用が期待される新たな基盤技術を構築している。本論文は以下の 5 章から構成される。

第 1 章は序論である。タンパク質工学の分野で利用されている既存の分子機能スクリーニング技術について概括するとともに、タンパク質ディスプレイ技術の特徴とその応用などを俯瞰している。特に、リボソームディスプレイ、タンパク質マイクロアレイについて、それぞれの技術的特徴とその長所、短所を議論した上で、これらの技術を統合した RD マイクロアレイ技術により従来の限界を克服する可能性を提示、本論文の目的を明らかにしている。

第 2 章では、DNA オリゴマーで修飾した基板上にハイブリダイズ結合させて形成した mRNA マイクロアレイから出発し、RD マイクロアレイを形成するために考案された戦略と、この戦略に沿って開発されたチップ作製技術について報告している。まず、従来の RD で用いられる終止コドンの排除あるいは、リボソームを停滞 (stalling) させるための塩基配列の導入による RD マイクロアレイの作製を試み、リボソームが有するヘリカーゼ活性のため、RD 複合体が固定用 DNA オリゴマーから解離するという不都合が生じることを明らかにしている。さらに、これを解決するため、光架橋機能を有する人工核酸 *cnvK* を mRNA 固定用 DNA オリゴマーに組み込み、mRNA と DNA 間に共有結合を形成する手法を開発している。本技術では、従来の RD 作製で必要であったライブラリ

一の DNA テンプレートの修飾作業がもはや必要ないという利点がある。

第 2 章では、金-チオール結合により DNA オリゴマーを固定した基材上に RD を形成する方法を報告しているが、第 3 章においては、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) の自己組織化単分子膜 (Self Assembled Monolayer; SAM) を修飾したガラス基材上に DNA オリゴマーを固定した基材を作製し、温度や pH を変化させたときの DNA オリゴマーと基材間の結合安定性について、金-チオール結合を用いる場合と実験的に比較し、検討している。その結果、pH や温度を変化させた環境下でのタンパク質機能の定量的評価のためには、APTES 修飾した基材を用いることがより好ましいことを結論し、最適化された APTES 処理を施された基材上に、分子固定密度の均一性に優れる RD マイクロアレイを形成可能であることを報告している。

RD マイクロアレイでは、同一スポットにタンパク質とその遺伝情報 (1 次構造を決定する情報) を保持する mRNA が共固定されるため、タンパク質の機能解析と遺伝情報分子の回収を、同一のプラットフォーム上で実施できる可能性がある。そこで、第 4 章では、RD マイクロアレイの応用として期待される、変異タンパク質ライブラリーの高効率機能スクリーニングへの適用について、その実現可能性を検証している。即ち、RD マイクロアレイにおけるタンパク質の機能解析と遺伝情報の回収について、実験的に検証した結果をまとめている。前者においては、緑色蛍光タンパク質 GFPuv4 を用いて、タンパク質の本来の機能である発蛍光性が損なわれることなく、RD マイクロアレイのフォーマット上でも発現されることを確認している。後者においては、(1)基材上に固定された mRNA を直接回収する方法、ならびに(2)mRNA マイクロアレイを形成する過程で BEAMING 法により得られる DNA を表面に固定したビーズを回収する方法の 2 つが利用可能であることを報告している。

第 5 章は以上の総括であり、RD マイクロアレイ技術の現状と残された課題、さらに応用展開も含めた今後の展望について述べている。

以上、本論文はタンパク質の分子機能を高効率にスクリーニングすることを目的とする新たな生体分子マイクロアレイの作製技術の開発、ならびに提案された技術の概念実証を得るための実験的研究の成果をまとめたものである。最終的に、RD マイクロアレイ技術をはじめて構築し、本技術をタンパク質の分子進化に応用する可能性を提示するに至っている。これらの成果は、バイオエンジニアリングの観点から有用性が高く、学術的にも価値が高いと判断される。よって、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。