

リポソームディスプレイ法

Liposome Display

膜タンパク質に適用可能な進化分子工学技術！

- ・リポソーム内で遺伝子から膜タンパク質を合成、膜上に組み込み、機能発現を確認
- ・遺伝子に変異を導入した集団から、高機能な膜タンパク質をコードする遺伝子の選択に成功
- ・膜タンパク質に限らず他のタンパク質の機能進化も可能

【技術の概要】

膜タンパク質は、創薬のターゲット分子の50%を占め、細胞が外部環境を感知するのにも重要な役割を果たしている。

本技術は膜タンパク質を in vitro でエンジニアリングする分子システムである。

本技術により、進化分子工学的手法による高機能な膜タンパク質の効率的な創生が可能である。

註) 本技術の詳細については右記URLをご参照ください

<http://www.jst.go.jp/chizai/news/biojapan2017.html>

リポソームディスプレイの概略図

低分子性分子、核酸、タンパク質、リン脂質

細胞サイズの人工脂質二重膜リポソーム

DNA、膜タンパク質、再構成型セルフリータンパク質合成系

再構成型セルフリータンパク質合成系を用いてリポソーム内部で膜タンパク質を1分子のDNAから合成する。これにより膜に特定の膜タンパク質を局在させ、加えて進化分子工学に必要な遺伝型と表現型のリンクを確立する。特定の膜タンパク質をリポソーム膜上に提示(ディスプレイ)できることからリポソームディスプレイ法と命名。

<要素技術1>

再構成型セルフリータンパク質合成系の合成活性の最適化

Reconstituted by mixing 69 defined components

Improved system: No DNA, batch, dialysis

PURESYSYSTEM: His-Tagged Transcription/Translation Factors, Ribosome, tRNA, NTPs, Amino Acids, Salts, Buffer

Shimizu, Y et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19(8), 751-755.

- We can alter the concentration of any of the components.
- We can remove or add any desired components.
- Proteins with various size could be synthesized at 4 mg/mL.
- 30% of total protein was synthesized protein, similar to *E. coli*.

本再構成型セルフリータンパク質合成系はPURE®frex2.0の製品名で販売中

Large-scale Protein synthesis simulator

Substrates for protein synthesis: tRNA, mRNA, EF-Tu, GTP...

Large-scale simulation: 241 components, 968 reactions

Matsuura, T. et al., PNAS, 2017

- 再構成型セルフリータンパク質合成系の全成分大規模数値モデルの開発に成功
- 計算機上で再構成型セルフリータンパク質合成を完全にシミュレーション可能

Simulation: MGG peptide synthesis

time course of MGG peptide

time course of 241 components

How to understand this high-dimensional data? => Please refer to the paper below (Matsuura et al., PNAS, 2017)

- Lag time of less than a minute was observed.
- Rate of peptide synthesis was similar to experimental value (0.15 vs 0.1 aa/sec).
- Concentration changes of all components were visualized.
- Some components reached their final steady-state through multiple quasi-steady-state.

本技術によりリポソーム内で合成された膜タンパク質の例

α-hemolysin: Pore forming protein from *Staphylococcus aureus*

EmrE: Multidrug transporter from *E. coli*

SecYEG: Protein translocase from *E. coli*

本技術を用いた膜タンパク質の進化分子工学 (α-hemolysinの例)

AF488 ligand fluorescence (a.u.)

Time (min)

変異がタンパク質-膜界面に局在

人工脂質二重膜上でのナノポア形成活性が30倍程度向上

<要素技術2>

細胞サイズのリポソームの調製法とその内部でのセルフリータンパク質合成技術の確立

Water-in-oil emulsion transfer method

従来法: 調製可能な Giant unilamellar vesicle (GUV) の粒子数が少ない (数百粒子/mL) => 進化分子工学に適用不能

IS: inner solution is cell-free protein synthesis system
OS: outer solution contains small chemicals essential for protein synthesis

- Unilamellar vesicles can be prepared.
- 10⁸/mL cell-size liposome (1-100 fL) can be prepared in 30 min.

【想定される用途】

- 診断医療に応用可能な高感度バイオセンサーの開発
- 創薬ターゲット膜タンパク質 (GPCR, トランスポーター、イオンチャネル) の生産と創薬の促進
- ナノポアシーケンサ (次世代型の核酸配列解析装置) 用のナノポアタンパク質の改良

【ライセンス可能な特許】

- 一枚膜リポソームを用いた酵素進化法の開発 (特許第5467320号)
- インビトロ膜蛋白質進化分子工学的手法 (特許第6016011号、WO2014002424)

代表発明者:

松浦 友亮
大阪大学大学院 工学研究科 生命先端工学専攻 准教授

連絡先 : JST知的財産マネジメント推進部
ライセンス担当

phone: +81-3-5214-8486
e-mail: license@jst.go.jp