

分子ディスプレイによる創薬基盤技術の展開

芝崎 誠 司

Development of Platform Technology Using Molecular Display

Seiji SHIBASAKI

*Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences,
1-3-6 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8530, Japan*

(Received June 17, 2009)

Techniques for immobilizing proteins on surface of virus or microorganisms, namely molecular display technologies, have played important roles in helping the elucidation of protein-protein interactions in cells and to develop research on drug discovery. Phage display system is well-established and sophisticated; consequently, bioactive low-molecular-weight ligands and proteins significant in pharmaceutical industry have been found. In addition to the development of novel functional proteins by phage display using results from experiments in genomics and proteomics, ribosome display or yeast display systems have been developed as complementary methods. We can select the appropriate method on the basis of the objective. Molecular display using yeast has advantages in production of desired proteins from combinatorial library by flow cytometry. Firstly, principle, development procedure, and latest research in this field are introduced. Thereafter, results of molecular display using yeast for antibodies and their related proteins are presented. Furthermore, display of receptor coupled with intracellular signal transduction—a novel type of molecular display on yeast cell surface—has been created in recent years. The role and potential of molecular display technologies employing yeast cells in drug discovery are discussed.

Key words—molecular display; yeast; Protein A; antibody; receptor

1. はじめに

ウイルスや微生物の表層にタンパク質分子やペプチド分子を提示させる分子ディスプレイ法、特にファージディスプレイは種々の生命現象を支配する細胞内外での分子間相互作用の解明や、創薬研究の一端を担ってきた。^{1,2)} 現在、ファージディスプレイを駆使するための知見は数多く蓄積され、生理活性を有する分子リガンドや医薬として機能し得るタンパク質・ペプチド分子が取得されるに至っている。³⁾

今後ゲノミクスやプロテオミクスにより得られた情報は、ファージディスプレイを用いた新機能分子の創出を加速するものと思われるが、後発のリボソームディスプレイや酵母ディスプレイなどにより、ファージを用いる系では対応できなかった分子ディスプレイライブラリーの構築や選択法が出現

し、用途に応じた使い分けも次第に明確になり、¹⁾ それぞれが補完的な技術要素として発展しつつある。なかでも酵母分子ディスプレイでは、フローサイトメーター等ハイスループットなスクリーニングシステムを用いることで、ライブラリー細胞集団から、望む機能を有する分子や細胞を濃縮、若しくは単離できるという利点がある。

本稿ではまず、分子ディスプレイの全体像を概観し、酵母分子ディスプレイ法の原理、ならびに研究の最前線を解説する。特に創薬と関連が深い抗体や抗体関連分子のディスプレイについて紹介する。また、近年では分子の細胞表層固定化技術に加え、受容体タンパク質をディスプレイする技術も生まれるなど、細胞内情報伝達系と共役させた次世代型の分子ディスプレイ法についても解説し、これらの創薬基盤技術としての展望を述べる。

2. 分子ディスプレイの概要

次世代シーケンサーに代表されるように、多くの生物のゲノム情報の解析はかつてない速度で進み、これに伴いゲノムにコードされるタンパク質の機能

兵庫医療大学薬学部医療薬学科 (〒650-8530 神戸市中央区港島 1-3-6)

e-mail: seiji@huhs.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである。

解析は新たな局面を迎えている。これまで、生化学、分子生物学的研究においては、タンパク質の発現系として主に、細胞内発現と細胞外分泌発現の2つの系が利用されてきた。現在、プロテオミクのようにタンパク質を網羅的に機能・構造解析する場合においても、基本的にはこれらのように宿主細胞の転写翻訳システムに依存している場合が多数である。しかし、細胞内発現系では、タンパク質の細胞内での蓄積による毒性や、不活性なインクルージョンボディーとなることが多く、うまく発現できた場合でも細胞破碎や精製プロセスが必要となる。インクルージョンボディーの解決には、これらの操作にリフォールディングのプロセスが別途必要となる。また、細胞外分泌発現系を用いた場合は、タンパク質分子の濃縮操作が必要であり、プロテアーゼなどの酵素による分解を阻害する必要が生じる。そこで、細胞の転写翻訳系を用いつつも、これら両者の問題の解決に向けた新しい発現系として「分子ディスプレイ法」が開発されている。

分子ディスプレイの中で最も歴史が長いファージディスプレイは、Smithらにより最初に報告²⁾されて四半世紀を迎える現在でも、多くの研究者に利用されており、相互作用タンパク質の探索やアフィニティリガンド分子の選択法として、そのプロトコルが確立している。一方、大腸菌や乳酸菌などのバクテリア等においても、ファージディスプレイほど一般的とは言えないが、様々な工夫を導入した分子ディスプレイ法が報告されている。大腸菌 *Escherichia coli* の系では外膜タンパク質の LumO⁴⁾ や OmpA,⁵⁾ 乳酸菌⁶⁾ *Lactobacillus* や *Lactococcus* では表層タンパク質の Proteinase P をアンカーとして細胞最外殻層に目的タンパク質をディスプレイできる。また、リボソームディスプレイは無細胞抽出系を用いたシステムであり、タンパク質とそれをコードする RNA をリボソームを介して連結させる。終止コドン欠失させ、DNA スペーサーを付加した mRNA を用いてタンパク質合成を行わせることで、タンパク質分子をリボソームにディスプレイするという仕組みである。

上記のようなディスプレイ系に対して、酵母ディスプレイ系は宿主細胞が真核生物由来タンパク質の発現に有利であることに加え、フローサイトメータによるソーティングが可能であるという長所を備え

ている。さらに、ハイスループットなスクリーニング系で選択されたクローンを用いて、直接目的分子の増幅や生産系へ持ち込むことが可能など大きな利点を持つ。これまでいくつかの種類の酵母を用いた分子ディスプレイが報告されているが、次項からは主に、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主とした分子ディスプレイシステム^{1,7)} について解説したい。

3. 酵母分子ディスプレイの原理

まず、酵母ディスプレイ系においてタンパク質提示の足場となる *S. cerevisiae* の細胞壁の構造と、タンパク質が表層へ到達するまでのメカニズムについて解説する。*S. cerevisiae* の最外殻に位置する細胞壁は、 β -1,3-と β -1,6-グルカン骨格とし、2つのタイプのマンナンタンパク質を含んでいる (Fig. 1)。マンナンタンパク質の1つは非共有結合によりほかの細胞壁成分に結合しており、熱 SDS により抽出されるものであり、もう一方は共有結合により結合していて酵素グルカナーゼにより抽出されるものである。酵母分子ディスプレイでは、目的タンパク質のアンカーに後者の細胞壁タンパク質がしばし

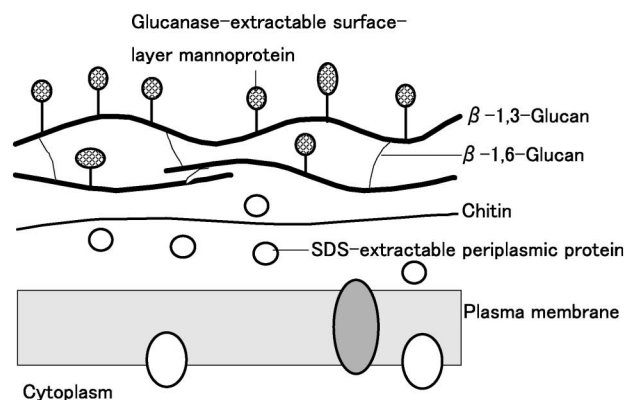


Fig. 1. Structure of Yeast Cell Wall

Most-outer surface of yeast cell is surrounded by β -1,3- and β -1,6-glucan. Glucanase-extractable surface layer mannoproteins are covalently linked to these components.



芝崎誠司

兵庫医療大学薬学部・准教授。2001年京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻博士後期課程修了。工学博士。2001年神戸市立工業高等専門学校助手、2002年同講師、2005年同助教授。2004年スウェーデン王立工科大学客員研究員。2007年より現職。現在の研究テーマ：酵母分子ディスプレイによる新規機能分子並びに新規細胞の創出。

ば用いられ、例えば、 α -アグルチニン、Flo1あるいはCwp1などによる表層ディスプレイが報告されている。筆者らが行ってきた性凝集素タンパク質 α -アグルチニンを活用した酵母分子ディスプレイシステムの原理を以下に示す。

α -アグルチニンの分子構造は3つに区分することができ、分泌シグナル、機能ドメイン、細胞壁ドメインより構成されている。また細胞壁ドメインは、セリンとスレオニンに富む320アミノ酸残基と、このC末端にGPI (Glycosylphosphatidylinositol) アンカー付着シグナルが存在するという特徴を持っている。このような構造を有する α -アグルチニンの、分泌シグナルと機能ドメインに手を加えることで、目的とするタンパク質を細胞表層へディスプレイすることができる。ここで鍵となるのが、分泌シグナルの配置と、遺伝子発現におけるプロモーターの選択である。Fig. 2(A)のように、目的タンパク質をコードする遺伝子の5'末側に分泌シグナル、3'末側に α -アグルチニン細胞壁ドメインの遺伝子配列を融合させることで、Fig. 2(B)のように、エキソサイトーシスにより融合タンパク質は細胞膜へ到達することになる。GPI アンカーはPI-PLC (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C) の作用で切断され、最終的に目的タンパク質は α -アグルチニンを介して、細胞壁に固定化されることになる。分泌シグナルは、 α -アグルチニン由来のものを用いてもよいが、酵母細胞内で機能するシグナルであれば異種タンパク質のものでも適用することができる。実際、多くの酵母分子ディスプレイ系では、

糸状菌由来のグルコアミラーゼの分泌シグナル配列が用いられている。また、プロモーターに関しては、構成発現型か、若しくは誘導発現型が適しているのかを目的に応じて判断する必要がある。なるべく多くのタンパク質をディスプレイし、提示した酵素分子と宿主細胞の代謝系とを共役させるような、いわゆる細胞触媒として利用する場合は、培養初期から発現する解糖系のグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のプロモーターのような構成発現型プロモーターが効果的であることが示されてきた。一方、外部環境にตอบสนองして蛍光タンパク質の提示量を変化させ、宿主細胞を細胞センサーとして機能を賦与する場合は、それぞれの環境因子にตอบสนองする誘導発現型プロモーターが適していると言える。^{8,9)}

これまで、上記のシステムを用いてディスプレイされたタンパク質分子には酵素分子が多く、これらの酵母細胞は様々な発酵プロセスにおいて、物質変換に必須の代謝酵素群を包括する細胞触媒として活用されてきた。このように異種酵素をディスプレイすることで、より付加価値の高い触媒能を酵母細胞に賦与¹⁰⁾できるだけでなく、外部環境に応じて蛍光タンパク質をディスプレイする細胞センサー^{8,9)}や、重金属捕捉ペプチド¹¹⁾やホルモン受容体¹¹⁾のディスプレイによるバイオレメディエーションの吸着担体として機能も見い出されている。

酵母分子ディスプレイ法の最大の利点は、培養により細胞を繰り返し利用でき、遺伝子配列さえ入手できれば、ほとんどのタンパク質やペプチドのディ

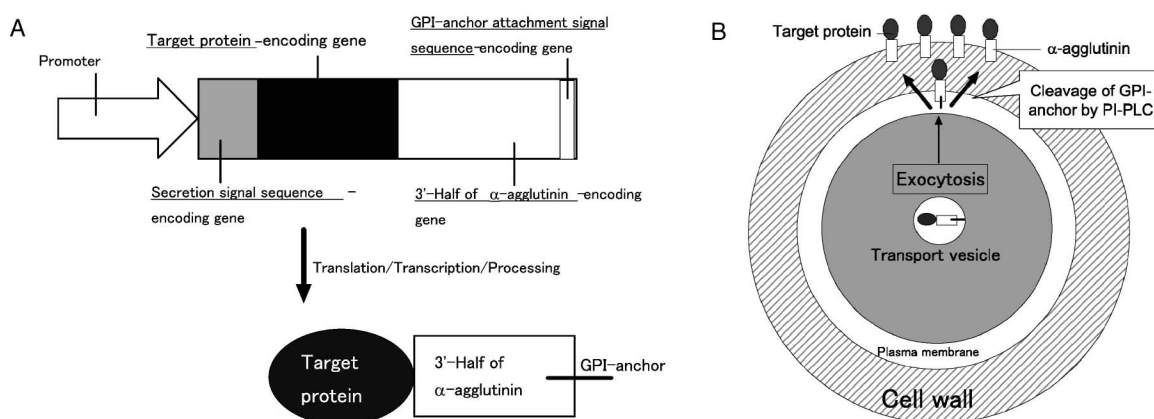


Fig. 2. Genetic Construction for Molecular Display and Transportation Mechanism

(A) A target protein-encoding gene is situated between secretion signal sequence- and α -agglutinin-encoding genes. (B) Fusion protein of a target protein and α -agglutinin is transported to cell surface via exocytosis.

スプレイが可能であるということである。さらに、酵素の熱あるいは pH に対する安定性向上にもつながることが明らかとなっている。¹²⁾

4. 創薬を志向した酵母分子ディスプレイの応用例

次に、薬学・創薬分野において活用が期待される応用例について紹介したい。

まず 1 つ目の応用例として、抗体回収系が挙げられる。一般的な生化学実験において IgG などの抗体分子を精製する場合は、特異的な結合性を示す黄色ブドウ球菌由来 Protetin A を、セファロースなどの担体に固定化したカラムを用いる。IgG は Fc 領域が Protein A と親和性を示すことが知られているが、Protein A の B ドメインのコンビナトリアル変異により創製された Z ドメインと特に高い親和性を示すことが明らかとなっており、^{3,7)} Z ドメインをコードする遺伝子は精製タグとして市販のベクターにも組み込まれている。生化学試薬など研究用抗体に加え、医薬として期待される抗体、あるいはその候補分子を回収するシステムに応用できるツールが分子ディスプレイ法により開発された。¹³⁾

Z ドメインをタンデムに融合した ZZ ドメインをコードする遺伝子配列が、Fig. 2 と同じ要領で目的タンパク質コード領域として配置され、マルチコピー型プラスミドにより作製された。ZZ ドメインを細胞表層に最大限にディスプレイするための、プロモーター、ならびに細胞株の検討が行われた。これまでの研究より、酵母一細胞あたり、 10^5 分子のタンパク質、ペプチドがディスプレイできることが明らかとなっている¹⁴⁾が、これまでは、細胞株とプロモーターの組み合わせからの検討はほとんどなされていなかった。そこで、分子ディスプレイ系に汎用されてきた MT8-1 に加え、W303-1a, BY4741, BY4742 株を用いて、GLA1 (ガラクトース誘導性) プロモーター、UPR-ICL (イソクエン酸リアーゼ) プロモーター、GAPDH プロモーターによる ZZ ドメイン分子ディスプレイについて検討した。ここで UPR-ICL のみ *Candida tropicalis* より取得された異種プロモーターで、グルコースが枯渇した際に転写を活性化する。その結果、BY4742 で GAL1 プロモーターを用いた場合に最も多くの ZZ ドメインを細胞表層にディスプレイできたので、以降この分子ディスプレイ系 BY4742: GUZZ 株が使用された。

次に、この BY4742: GUZZ 株を用いて、初期 pH などの最適培養条件について検討した。通常、酵母の増殖用培地の初期 pH は 5-6 付近であり、定常期に入る頃には pH 2-3 まで低下し、細胞表層上にディスプレイ分子された分子はこれらの培地と接触しているため、酸による変性を受けることが懸念される。そこで、BY4742: GUZZ 株において ZZ 発現を誘導するための培地であるガラクトース含有合成培地 (SDC-ura; カザミノ酸を含む) の培養開始前の初期 pH を 5.6-8.0 に調整し、培養後 Alexa-488 標識抗体と反応させ、細胞表層から得られる蛍光強度を FACS で測定、比較した。その結果、ZZ ドメインの分子ディスプレイには宿主としては、BY4742 株を使用し、GAL1 プロモーターの制御下で初期 pH 6.4 の SDC-ura 培地で培養した場合に、活性を有した Z ドメインが最も多くディスプレイされ、抗体、並びに Fc 融合タンパク質の回収系として利用できる可能性が示唆された。

次に、BY4742: GUZZ 株の表層に提示された ZZ ドメインにより、血清から IgG の精製が可能であることを確認した。さらに、酵母による抗体産生/回収モデル系として、酵母が分泌生産した Fc 融合タンパク質を ZZ ドメインに結合させ、精製できるシステムを考案した (Fig. 3)。まず、GFP-Fc 融合タンパク質の分泌生産とその回収系の構築を試みた。当初、同一の細胞で GFP-Fc 分泌生産と、ZZ のディスプレイを行ったが、分子ディスプレイも GFP-Fc 分泌生産系と同一の分泌システムを利用しているため、ディスプレイが十分に行われなかった。そこで、ZZ ドメインのディスプレイと、GFP-Fc の生産は別々の細胞に行わせることでこの問題を解決した。表層にディスプレイされた ZZ ドメインで GFP-Fc が捕捉できたことは、FACS 並びに蛍光顕微鏡で確認し、これらが酸による溶出、中和により効果的に回収できることが明らかとなった。さらに、GFP のようなレポータータンパク質に限らず、化学的活性を持つタンパク質についても適応可能であることを示すために、*Rhizopus oryzae* 由来のリパーゼ (ROL; *Rhizopus oryzae* lipase) を Fc と融合し、生産/回収系について検討した。ここでは、ROL の活性部位が C 末端側にあることを考慮し、ROL の N 末端側に Fc が融合され、Fc-ROL 分泌発現プラスミド pEU-ROLF2 を酵母細胞に導

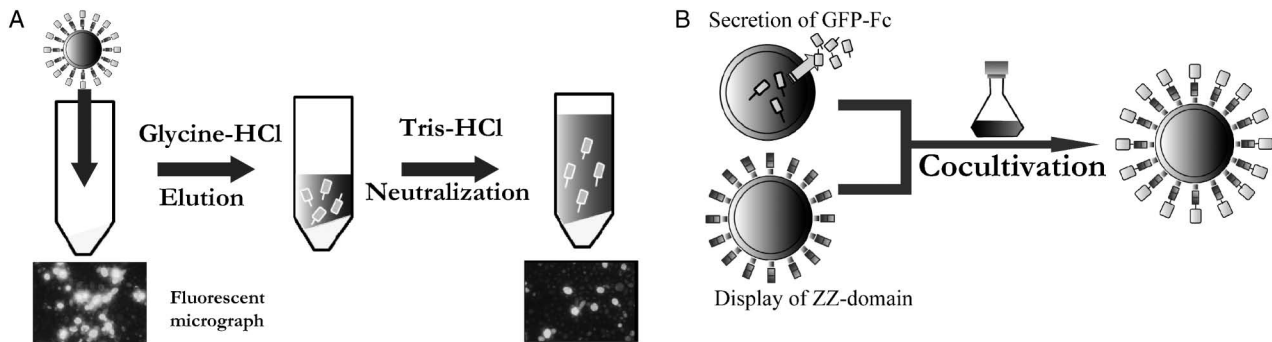


Fig. 3. Recovery System of Antibodies and Related Molecules Using ZZ-domain Displaying Yeast Cell

(A) GFP-Fc fusion proteins are bound on yeast cell surface displaying ZZ-domain and released by glycine-HCl. Neutralization by addition of Tris-HCl into the acidic supernatant must be performed immediately. (B) Synergistic production and recovery of secreted recombinant Fc-fusion proteins.

入して BY4742: ROLF2 株を得た. この株と BY4742: GUZZ の共培養により, GFP-Fc の場合と同様に Fc-ROL 融合タンパク質を回収したが, より高い回収率を得るために, 共培養を開始するタイミングについても検討した. その結果, ZZ ディスプレイ細胞 BY4742: GUZZ を先行して培養し, 6-18 時間のタイムラグを設けて Fc-ROL 分泌細胞を培養系へ加えたときに, 同時に共培養を開始したときの 1.5 倍の回収率が得られた.

2 つ目の応用例として, タンパク質分子ライブラリーの構築が挙げられる. ゲノム情報が解明されるにつれ, それらの情報がコードするタンパク質分子の機能解析が重要な課題となっている. 特に創薬分野における標的分子と相互作用するタンパク質分子の網羅的な解析では, 分子ディスプレイ法を活用したタンパク質分子ライブラリーの構築が期待される. 酵母細胞を用いたライブラリーは, フェージやバクテリアの系では困難な, FACS やマイクロチャンネルアレイなどのハイスループットスクリーニングシステムにて解析が可能であるという利点を生かすことができる. 分子ディスプレイによる酵母モデルライブラリーの構築と, そのスクリーニングの効率を検討した結果を以下に述べる.¹⁵⁾

コンビナトリアルなタンパク質をディスプレイした細胞集団の中から, 目的分子と相互作用するクローンとして, 上述の Protein A と Fc の組み合わせが, 相互作用のモデルとして適用された. ただし, この場合は先の抗体回収系とは異なり, Fc を細胞表層にディスプレイし, Alexa488 標識した Protein A を相互作用の標的分子として結合させることになる. 本系に関しては, プロモーターを検討

した結果, *UPR-ICL* が Fc ディスプレイ量に最も優れていることが確認できたので, 同プロモーターを用いて Fc ディスプレイ細胞が調製された. Fc ディスプレイ細胞と非ディスプレイ細胞数の比率を, $1:10^4$, $1:10^5$ ならびに $1:10^6$ に設定し, Alexa488 標識 Protein A ($10 \mu\text{g/ml}$) と反応させた後, フローサイトメーターにより, Fc ディスプレイ細胞の回収が試みられた. 回収率は, ソーティングした細胞集団の一部を SDC 平板培地にて生育させてコロニーをピックアップし, Fc をコードする遺伝子を PCR により同定することで算出している. 第 1 サイクルでは 70% ($1:10^4$) 若しくは 20% ($1:10^5$) の回収率が得られたが, $1:10^6$ の集団からはほとんど回収できなかった. しかし, 第 1 サイクルでソーティングした集団をもう一度同条件で培養し, フローサイトメーターによる回収を繰り返したところ, 第 2 サイクルでは $1:10^6$ の集団を含むほかの 2 つのグループについても, ほぼ 100% の回収率が得られた. ここで用いたモデルライブラリーは, あくまでも Fc-Protein A という既知の分子による相互作用を利用したものであるが, フローサイトメーターにより極微量のポジティブクローンを含む細胞集団から, 標的分子と結合したクローン分子をディスプレイしている細胞を効果的に回収できることを示唆している.

5. 新しい酵母分子ディスプレイの可能性

これまで, 細胞内輸送システムと細胞壁アンカーによる分子ディスプレイについて記述したが, ここでは同じ酵母細胞を用いた, 新しい分子ディスプレイの可能性を示唆する研究の流れについて紹介したい.

まず、リガンドスクリーニング系について述べる。これまで、酵母細胞を宿主とするレポーターを用いた各種アッセイ系として、栄養要求性遺伝子と選択培地を用いた増殖による選別や、 β -ガラクトシダーゼなど酵素活性による解析などが利用されている。これらの方法は現在でも汎用されており、特別な実験機器類を用いずにアッセイができるという利点がある一方、増殖選別では細胞の生育に時間を要し、酵素活性による解析では測定毎に基質を添加する必要があるなど、一度に多数のアッセイが必要な場合には限界がある。そこで、より簡便で定量的な評価が行えるシステムとして、蛍光タンパク質の発現をレポーターとしたヒト GPCR (G-protein coupled receptor) の酵母細胞膜へのディスプレイと、その細胞を用いたアッセイ系が開発されている (Fig. 4).¹⁶⁾ モデルとして、ヒトソマトスタチンレセプター (SSTR5) を酵母細胞膜上にディスプレイするにあたり、酵母の内在性 GPCR が破壊され、SSTR5 をディスプレイするための遺伝子が導入された。これにより、内在性 GPCR の競合発現が抑制されると期待でき、GFP レポーターを含む SSTR5 ディスプレイ酵母株に、SSTR5 のリガンド分子であるソマトスタチン (S-14) を添加し、蛍光強度がフローサイトメーターにより計測された。その結果、S-14 の添加に反応してレポーターの GFP による蛍光を検出するに至っており、細胞膜上にデ

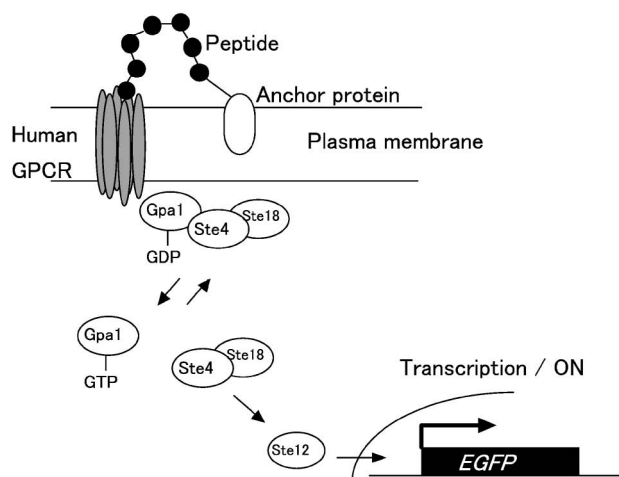


Fig. 4. Molecular Display of Human GPCR on Yeast Plasma Membrane

Ligand-candidates (peptides) can be displayed on the same surface using anchor protein. The expression of EGFP is activated via MAPK-signal transduction when a ligand stimulates a GPCR in this system.

ィスプレイした SSTR5 から G タンパク質を介してシグナルが伝達されたと理解できる。さらにリガンドのペプチドは、Fig. 4 のようにアンカータンパク質と融合し、ライブラリー化が可能であることも明らかとなっている。このように、ヒトレセプターのアッセイ系として、酵母細胞膜にディスプレイしたレセプターの機能を、細胞内蛍光シグナルの発現量により迅速、かつ定量的に評価できることが明らかとなり、本システムにより医薬候補化合物分子となるリガンドのスクリーニングに展開できると期待される。

次に、細胞質側への分子ディスプレイ系について述べる。前項での細胞壁アンカーによる分子ディスプレイ、本項目で述べたディスプレイ系のいずれにおいても、目的分子を細胞の外側に固定し、提示する技術であったが、細胞質側に固定することも可能で、これにより目的分子と細胞質に存在するタンパク質、あるいは発現量や時期をコントロールしたタンパク質との相互作用が検出できる。ここでは、Snc2 タンパク質の細胞膜ターゲティングドメイン (MTD; membrane-targeting domain) による Z ドメインの固定化と、細胞質に発現させた Fc の相互作用を FRET (Fluorescent resonance energy transfer) により検出する系¹⁷⁾について述べる (Fig. 5)。Snp2 は Synaptobrevin のホモログで、標的分子の膜輸送を仲介しており、この C 末側領域の膜貫通ドメイン (CTM; C-terminal transmembrane domain) が、Z ドメインの固定化部位として利用できる。また、Z ドメインならびに Fc に融合する蛍光タンパク質としては、FRET を引き起こし得る蛍光特性を有する様々な分子の組み合わせが考えられるが、ここでは ECFP (Enhanced cyan fluorescent protein) と EYFP (Enhanced yellow fluorescent protein) が選択された。Z ドメインならびに Fc に融合したタンパク質が酵母細胞内で共発現され、FRET 現象について検討が行われた。コントロールとして、ECFP-Z 融合タンパク質を細胞質内で発現させた場合は、ECFP の励起光 (440 nm) では、ECFP からの蛍光シグナルしか検出されなかったが、ECFP-Z 融合タンパク質を MTD により細胞膜に固定化した場合には、ECFP の励起光により EYFP の蛍光 (535 nm)、すなわち FRET シグナルが検出できた。ここで MTD として、他の細胞膜局在タンパク

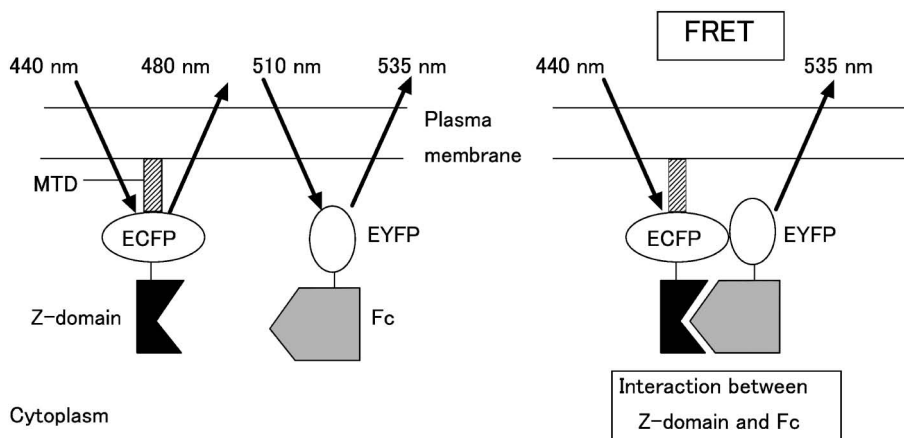


Fig. 5. Immobilization of Proteins in Cytoplasmic Face to Observe Protein-protein Interactions by FRET

質として Ras2 タンパク質のものも利用が検討されているが、酵母での FRET によるタンパク質相互作用検出系においては Snc2 の方が FRET 効率がよいことも確認されている。また、本手法の細胞内におけるタンパク質相互作用検出系としての利点は、蛍光顕微鏡により可視化できることに加え、一方を細胞膜に局在化させることにより、細胞質全体に発現させて結果的に相互作用を観察したい両者を拡散させてしまう場合と比較すると、検出効率がよいということも挙げられる。

6. おわりに

以上、分子ディスプレイの背景、酵母分子ディスプレイの原理と概要、並びにその応用例として創薬基盤技術の可能性を秘める要素技術の一部を概説した。本技術により創製された細胞は「アーミング酵母 (Arming yeast)」として C&E News で紹介され¹⁸⁾て以来、様々な報文においても同名称が使用され、多くの研究者の注目を集めて今日に至っている。また、分子ディスプレイにより「アーミング」した酵母自身がワクチンとなり、医薬としての可能性を有していることを示す論文が既に報告され始めている。¹⁹⁾ 経口ワクチンとしてヒトに適用する場合は、遺伝子組換えの問題をクリアする必要があるが、non-GMO という新しいスタイルの分子ディスプレイ法が開発されており、²⁰⁾ インフルエンザを始めとする各種感染症予防ワクチンとしての活用も十分に考えられる。今後、様々なスクリーニング技術 (ハード) の活用により、本手法により創製された分子や細胞が創薬研究の進展に貢献するものと期待できる。

謝辞 本稿で紹介した分子ディスプレイの応用例は、筆者の前研究室に在籍した卒研究生諸氏、ならびに共同研究者である神戸大学大学院の近藤昭彦教授との共同研究による成果であり、分子ディスプレイ技術の開発者である京都大学大学院農学研究科植田充美教授と同グループによる共同研究の成果もあわせて、総説としてまとめさせて頂いたことを深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Shibasaki S., Maeda H., Ueda M., *Anal. Sci.*, **25**, 41-49 (2009).
- 2) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315-1317 (1985).
- 3) Nord K., Gunneriusson E., Ringdahl J., Ståhl S., Uhlén M., Nygren P. A., *Nat. Biotechnol.*, **15**, 772-777 (1997).
- 4) Hofnung M., *Methods Cell Biol.*, **34**, 77-105 (1991).
- 5) Stathopoulos C., Georgiou G., Earhart C. F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 112-119 (1996).
- 6) Maassen C. B., Laman J. D., den Bak-Glashouwer M. J., Tielen F. J., van Holten-Neelen J. C., Hoogteijling L., Antonissen C., Leer R. J., Pouwels P. H., Boersma W. J., Shaw D. M., *Vaccine*, **17**, 2117-2128 (1999).
- 7) Shibasaki S., Ueda M., *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**, 19-27 (2009).
- 8) Shibasaki S., Ueda M., Ye K., Shimizu K., Kamasawa N., Osumi M., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 528-533 (2001).
- 9) Shibasaki S., Ninomiya Y., Ueda M., Iwa-

- hashi M., Katsuragi T., Tani Y., Harashima S., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 702–707 (2001).
- 10) Ueda M., Tanaka A., *Biotechnol. Adv.*, **18**, 121–140 (2000).
- 11) Kuroda K., Shibasaki S., Ueda M., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 697–701 (2001).
- 12) Ito J., Sahara H., Kaya M., Hata Y., Shibasaki S., Kawata K., Ishida S., Ogino C., Fukuda H., Kondo A., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **55**, 69–75 (2008).
- 13) Shibasaki S., Kawabata A., Ishii J., Yagi S., Kadonosono T., Kato M., Fukuda N., Kondo A., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 821–828 (2007).
- 14) Shibasaki S., Ueda M., Iizuka T., Hirayama M., Ikeda Y., Kamasawa N., Osumi M., Tanaka A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 471–475 (2001).
- 15) Fukuda N., Ishii J., Shibasaki S., Ueda M., Fukuda H., Kondo A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 151–158 (2007).
- 16) Ishii J., Matsumura S., Kimura K., Tatematsu K., Kuroda S., Fukuda H., Kondo A., *Biotechnol. Prog.*, **22**, 954 (2006).
- 17) Shibasaki S., Kuroda K., Nguyen H. D. Mori T., Zou W., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 451–457 (2006).
- 18) Anonymous, *Chem. Eng. News*, **75**, 32 (1997).
- 19) Tamaru Y., Ohtsuka M., Kato K., Manabe S., Kuroda K., Sanada M., Ueda M., *Biotechnol. Prog.*, **22**, 949–953 (2006).
- 20) Miura N., Aoki W., Tokumoto N., Kuroda K., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 293–301 (2009).