

平成18年 2月 28日

氏名 小嶋 美樹



## 21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科

応用化学専攻、化学システム工学専攻、

化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成17年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	こじま みき 小嶋 美樹	生年月日
所属機関名	東京大学工学系研究科化学生命工学専攻蛋白質工学研究室	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1 工学部5号館401	
申請時点での 学年	博士課程1年	
研究題目	診断およびプロテオーム解析のためのセンサー蛋白質の創出	
指導教員の所属・氏名	東京大学工学系研究科化学生命工学専攻蛋白質工学研究室 上田 宏	

## I 研究の成果 (1000 字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

2つの機能を持つ蛋白質として有用されているタグ付き蛋白質や融合蛋白質は、通常お互いの N/C 末端でドメインが結合されるためその応用に制限がある。そこで結合ドメインの大きさ、形、挿入箇所、配向性などの自由度の高い蛋白質の設計を可能にするため、円順列変異を利用した混成蛋白質作製を試みた。円順列変異体とは蛋白質本来の N/C 末端がペプチドを介して結合され、別の部位に新たな N/C 末端を持つ変異体であり、天然にも存在するほか最近いくつかの蛋白質でこの手法を用いた作製例が報告されているが、この変異導入による蛋白質の活性への影響については不明な点が多い。これまで本研究では、大腸菌アルカリフォスファターゼ(PhoA)の活性部位近傍ループ(91-93, 407/408)に新規末端を持たせた 2 種類の変異体を作製して活性のある変異体 cp90 を取得し、その新規末端残基である 93, 91 位をランダム化したミニライブラリ(cp90(T93X/K91X))からのスクリーニングにより、野生型より比活性の高い変異体の選択に成功している。

さらにホモジニアス測定系への応用を目指し、センサー部位として抗体 Fc 結合性ペプチドペアを連結させた円順列変異体を作製し、抗体添加により酵素活性が制御される変異体の取得を試みた。cp90(T93X/K91X)の新規両末端に、Protein A 由来の  $\alpha$ ヘリックス形成能の高い部分配列 (ZN15, ZC17) を結合させたミニライブラリ (ZN15-cp90(T93X/K91X)-ZC17, ZC17-cp90(T93X/K91X)-ZN15) を作製、スクリーニングを行った。酵素活性と Fc 結合能を有する (Fig. 1) 変異体の取得には成功したが、抗体結合による酵素活性の変化はみられなかった。また、これらの変異体はより低い  $K_m$  値を示し (Table 1)、末端に  $\alpha$ ヘリックス形成能の高い配列を持つ円順列変異体では基質に対するアフィニティーが向上したことが示唆された。末端配列依存的な活性パラメータの変化は、活性部位近傍に末端を持つ円順列変異体においては末端配列がその安定性と活性を大きく左右することを示しており、末端配列に対するリガンドにより活性が制御される新規アロステリック酵素への応用が期待される。

Table 1 Kinetic parameters

	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu M$ )
MCS-PhoA	13.5 $\pm$ 0.92	13.8 $\pm$ 2.9
<b>MCS-cp90</b>	<b>2.40<math>\pm</math>0.08</b>	<b>106<math>\pm</math>14</b>
ZN15-cp90(T93R/K91P)-ZC17 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.12	22.7 $\pm$ 5.5
<b>ZN15-cp90(T93R/K91P)-ZC17</b>	n.d. <sup>b</sup>	11.2 $\pm$ 1.5
ZC17-cp90(T93E/K91K)-ZN15	4.43 $\pm$ 0.13	57.7 $\pm$ 10.5
ZC17-cp90(T93G/K91P)-ZN15	2.80 $\pm$ 0.05	40.2 $\pm$ 4.9
ZC17-cp90(T93R/K91P)-ZN15	1.97 $\pm$ 0.01	39.1 $\pm$ 19.1

Substrate: p-Nitrophenylphosphate,  
Buffer: 1 M Tris-HCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, pH8.0

<sup>a</sup> Mutated in Fc binding site of ZN15 peptide with low IgG affinity.

<sup>b</sup> Not determined

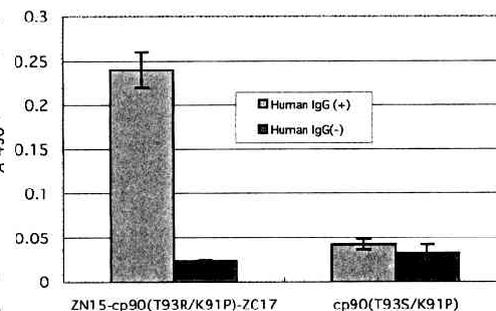


Fig. 1 Human IgG binding ability

氏 名 小嶋 美樹

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること.

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

Miki Kojima, Keiichi Ayabe, Hiroshi Ueda, Importance of terminal residues on circularly permuted *Escherichia coli* alkaline phosphatase with high specific activity, Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 100, No. 2, 197-202. 2005

(申請者が実験の中心的な役割を果たした。)

氏 名 小嶋 美樹

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者 (全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

○小嶋美樹、増田兼治、坂本健造、油谷隆秀、上田宏、抗体可変領域の抗原結合能と  $V_H/V_L$  相互作用に関する速度論的解析、平成 17 年度日本生物工学会大会、口頭発表、3C14-3、つくば、11月、2005年

○Miki Kojima, Keiichi ayabe, Hiroshi Ueda, Optimized circular permutants of *E. coli* alkaline phosphatase obtained by randomized terminal residues and tailing with  $\alpha$  helix forming peptides, 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, BIOL 0141, Honolulu, Hawaii, December, 2005,