

平成 16 年 3 月 1 7 日

氏名 多木 崇



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15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏 名	たき たかし 多木 崇	生 年 月 日
所 属 機 関 名	東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻	
所 在 地	〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1 電話 03-5841-7218	
申請時点での 学 年	博士課程 / 	
研 究 題 目	新規タンパク質セレクション法の探索	
指導教官の所属・氏名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 多比良 和誠	

I 研究の成果

背景

全ての生物において、酵素は様々な化学反応を触媒し、生命活動の維持に役立っている。また、酵素の持つ高い特異性と活性は医薬、工学、分析など多くの分野において応用が期待されている。従来の、酵素をデザインするという手法を補う有効な1つの方法として、近年、酵素を触媒活性をもとにセレクションする試みがなされている。ファージディスプレイ法は酵素のセレクション法の1つとして、今まで *in vitro* で酵素活性に基づいてセレクションを行うことを試みた報告例があるが、活性のある酵素を提示することや、基質と酵素を連結することなど、幾つかの困難があり、簡便で汎用性の高い手法が望まれている。

実験

ファージディスプレイ法を用いた酵素をセレクションする手法として図に示すようなモデル系を構築した。この系では酵素として大腸菌由来のリガーゼ型の酵素、ビオチンプロテインリガーゼ(BPL)を用い、分泌されたファージがその表面に酵素反応の反応物、ビオチンを提示するように設計した。ファージミドベクターに BPL、及び BPL が認識するペプチドとして報告のあったペプチド(B-tag)と M13 ファージのキャプシドタンパク質の融合タンパク質をコードした遺伝子を組み込み、大腸菌を形質転換した。この大腸菌を、ビオチンを含む培地中で培養し、そこにヘルパーファージを感染させた。BPL が大腸菌内でビオチンと B-tag を認識し、B-tag にビオチンを結合すると、分泌されるファージの表面がビオチン化されることになる。この系の特徴は酵素をファージ表面に提示する必要がないために、サイズの大きな酵素でもセレクション出来る点、*in vitro* での操作が簡便である点、及び、大腸菌内で触媒活性をもつ酵素をセレクション出来る点などである。

結果

実際に BPL を発現させた大腸菌から分泌されたファージを調べたところ、その表面がビオチン化されていることが分かった。BPL をコードするファージミドを持つ大腸菌と、BPL をコードしないファージミドを持つ大腸菌を混合し、分泌されたファージをアビジンに対してセレクションを行い、セレクション前後でファージのゲノムを調べたところ、セレクションを行うことで、BPL をコードしたファージミドが数倍から10倍程度濃縮されることがわかった。この際、大腸菌の内在性の BPL 活性が存在するため、濃縮効率が比較的低くなっていると考えられる。

今後の予定

BPL の基質認識部位をランダムアミノ酸配列に置換したライブラリーを作製したので、現在、このライブラリーを用いて天然には存在しないリガーゼ活性を持った酵素を選別中である。

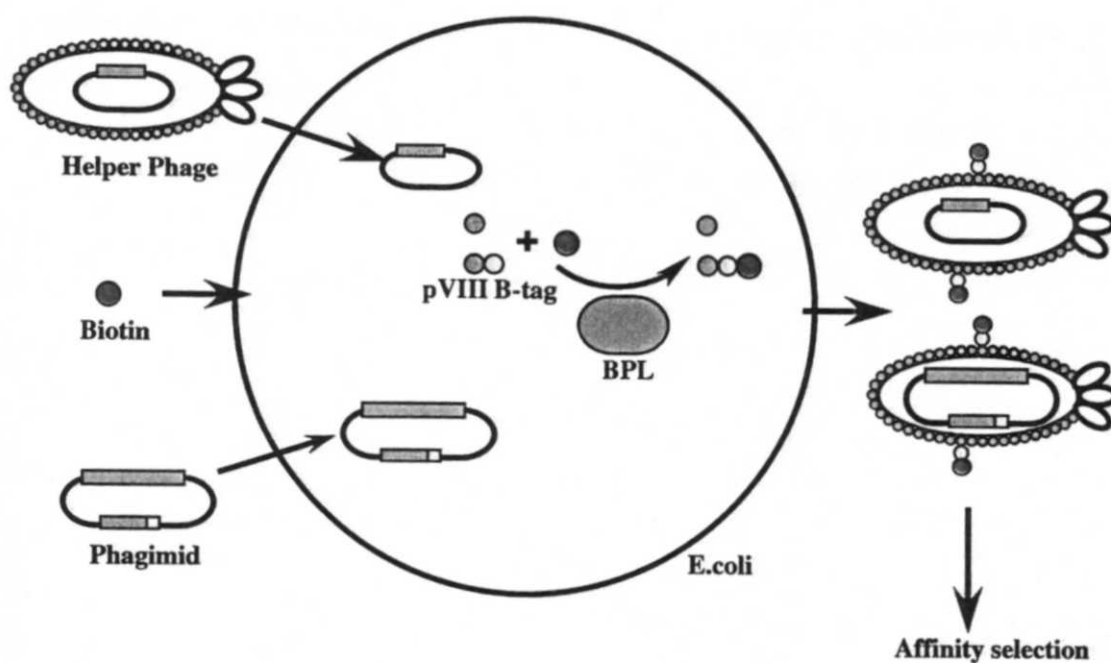


図 ファージディスプレイ法を用いた新規酵素セレクション法

- 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)

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

Takashi Taki, Satoshi Fujita and Kazunari Talra

Selection of an enzyme using phage display on the basis of catalytic activity *in vivo*

Canada-Japan Workshop on Emerging Complex Materials and Systems (2nd COE 21 Workshop, The Univ. of Tokyo and Univ. of Tronto Graduate Studens Workshop)

University of Tronto 2003,11,24