

平成 17 年 3 月 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16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 3年	
研究題目	ファージディスプレイ法を用いた、酵素活性を有するタンパク質セレクション法の構築	
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

酵素は生体内におけるほぼ全ての化学反応を触媒しており、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目的分子に結合するタンパク質のセレクションで広く用いられている手法であり、酵素活性を有するタンパク質のセレクションを目指したいくつかの報告があるが、有効な手法はまだ確立されていない。そこで、本研究では酵素を選択する1つの系を構築、提案することを目指した。

実験概要

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。この系では基質ペプチドにビオチンを付加する大腸菌由来の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ビオチンを提示するように設計した。In vitro でアビジンを用いたアフィニティーセレクションを行うことで、酵素分子をファージに提示させることなく酵素遺伝子の選択が可能になる。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。

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下していると考えられた。

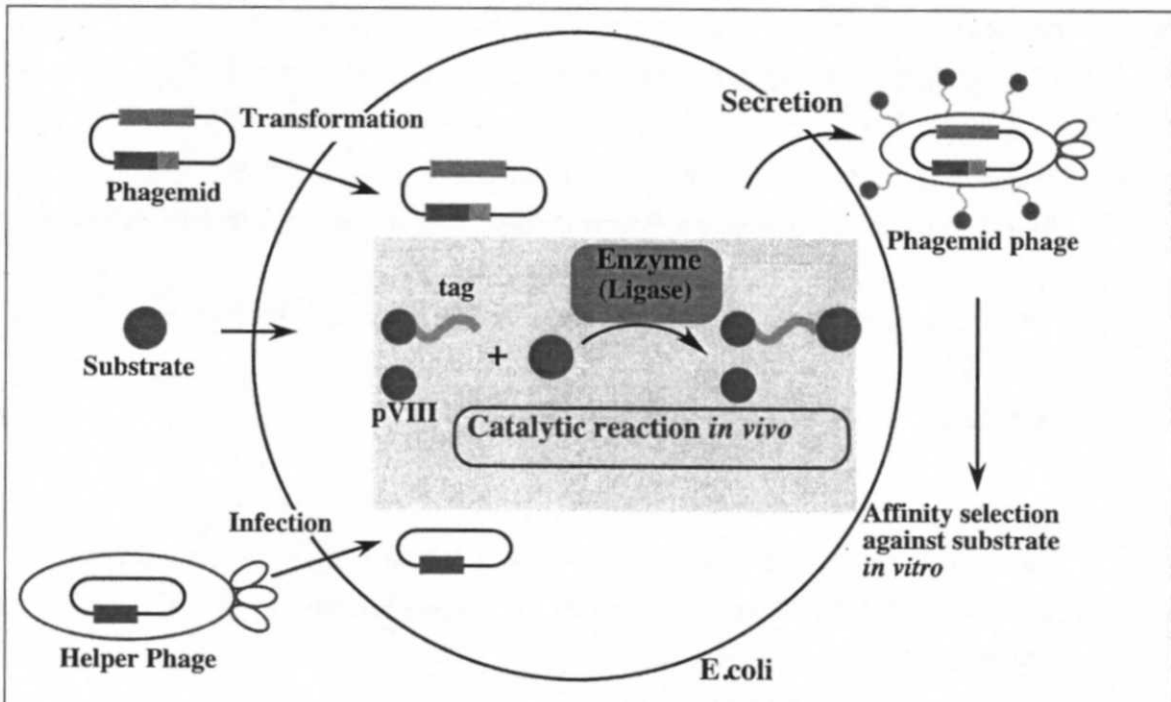


Figure Schematic representation of the novel selection of the active enzyme using phage display

- 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)

Taki, T., Fujita, S., and Taira, K. Selection of an active enzyme by phage display on the basis of the enzyme's catalytic activity *in vivo*. **ChemBioChem.**, 6, 315-321 (2005)

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)

Takashi Taki, Satoshi Fujita and Kazunari Taira

Selection of an Enzyme Using Phage Display on the Basis of Catalytic Activity *in vivo*.

Cambridge Healthtech Institute's Sixth Annual Phage Display Technologies

Cambridge, MA (USA)

April 26-27, 2004

Takashi Taki, Satoshi Fujita and Kazunari Taira

Selection of an enzyme using phage display on the basis of catalytic activity *in vivo*
2nd COE 21 International Symposium on Human-Friendly Materials Based on
Chemistry

Takeda Hall, The University of Tokyo

November 9th, 2004

多木 崇、藤田 聡史、多比良 和誠

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

東京大学 COE 「動的分子論に立脚したフロンティア基礎化学」

「化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成」合同シンポジウム

東京大学 弥生講堂

2004 年 6 月 25, 26 日