

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

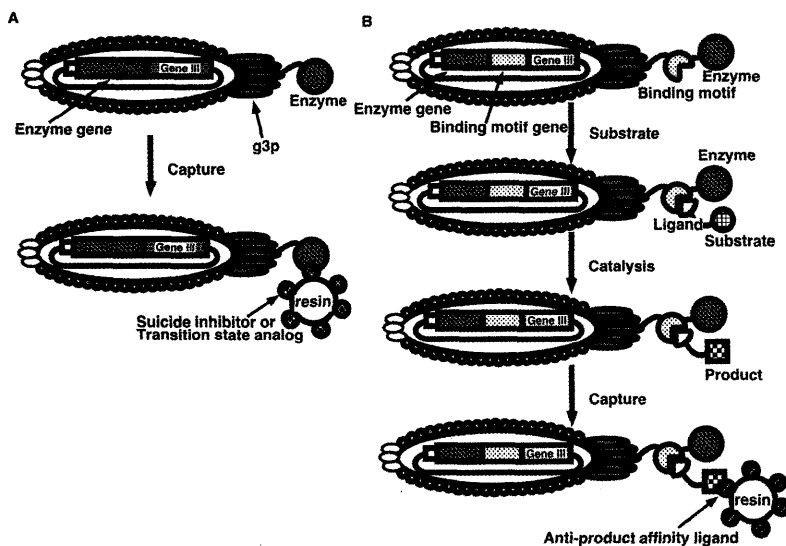
氏名 多木 崇

### 【緒言】

酵素は生体内で様々な化学反応を触媒しており、その高い選択性、活性を活かして、医療薬を始めとして、工業、環境分野など様々な分野で酵素が利用されている。また、様々な酵素の3次元立体構造が解析され、酵素反応機構も明らかにされてきており、そうした情報を利用し、天然の酵素に比べて高い活性を有する酵素、基質特異性を改変した酵素などを人工的に作り出す試みも盛んに行われている。新規の酵素を創出する手法としては、大きく次の2つのアプローチがとられてきた。1つは上で述べた情報を基に、酵素の活性に関与するアミノ酸に変異を導入して、酵素活性を改変するものである。このアプローチによって、酵素の特異性を改変したという報告がなされているが、改変したアミノ酸配列を有する酵素の立体構造、及び活性をモデリング等によって予測するのは必ずしも容易ではない。もう1つのアプローチは酵素全体、あるいは活性中心部位に、ランダムなアミノ酸配列を導入した多数の変異体ライブラリーを作製し、それらをスクリーニング、あるいは、セレクションする事により、意図した活性を持つ変異体を得るものである。このアプローチは酵素の構造、反応機構に関する詳細な情報が必須ではない事に加えて、目的の活性を持つ変異体を得た後、再び変異を導入してスクリーニング、セレクションするという一連の操作を繰り返す事で、生体分子の進化を人工的に模倣する事ができ、タンパク質、ペプチドのエンジニアリングに広く用いられている。

酵素活性をスクリーニングするためには、酵素反応の生成物が high-throughput なスクリーニングを行うのに適した性質を持つ必要があり、場合によっては多数の変異体をスクリーニングするのに多くの時間、コストがかかることになる。スクリーニングに比べ、セレクションの利点の1つは、変異体1つ1つを分析するのではなく、変異体ライブラリーをまとめて操作する事が出来る点にあり、より大きなサイズのライブラリーを扱う事が可能になる。酵素、あるいはタンパク質をセレクションする際には遺伝子型 (DNA, RNA) と表現系 (酵素を含めたタンパク質) を連結させる必要がある。この連結を利用し、表現系によって選択した酵素 (タンパク質) の配列に関する情報を、連結した DNA, RNA から容易に得る事が出来ると同時に、選択したタンパク質の増幅も DNA, RNA を増幅することにより可能になる。このような連結を実現する手法としては、ファージやリボソームを用いる手法のほか、ミセル等により分画する手法が報告されてきた。

ファージを用いた手法は、ファージゲノム中のファージ表面を形成するタンパク質をコードする遺伝子に、タンパク質、酵素をコードする遺伝子を融合させ、ファージ表面にタンパク質、酵素を提示させるもので、ファージディスプレイ法と呼ばれている。この手法は、多数の変異体 ( $10^8$  以上) を一度に扱える事、ファージを比較的短時間で増幅できる事などから新規結合能を有するタンパク質のセレクションに広く用いられてきた。しかし、タンパク質を標的分子への結合能によりセレクションする場合とは異なり、酵素をその活性を基にセレクションするのは決して容易ではない。酵素活性の唯一の指標となる生成物は酵素反応の終了後、拡散により酵素から離れてしまうためである。この問題を解決するため、ファージディスプレイ法を用いた幾つかの手法が試みられてきた。1つはファージに酵素を提示させ、遷移状態の類似体に対するアフィニティーにより酵素を選択する手法である (Figure 1(A))。この手法は遷移状態に関する情報が必須である他に、遷移状態類似体の合成が困難なことがある。また、遷移状態類似体に対する強い結合が、必ずしも高い酵素活性を反映しないことも問題であった。別の手法としてファージに酵素と基質



**Figure 1** (A) The selection of an enzyme displayed on phage by chemical linkage to a suicide inhibitor or to a transition-state analogs that is covalently connected to a solid support. (B) Selection of an enzyme by display of both enzyme and substrate on phage.

を同時に提示させる方法も報告された (Figure 1(B))。この場合 *in vitro* の酵素反応後、生成物に対するアフィニティーを利用して酵素を選択することになる。この手法は酵素反応の詳細なメカニズムが必要でないこと、より直接的に酵素活性を選択できる点が優れているが、酵素を分泌する必要があるため、活性を維持した酵素を提示させる事が困難な場合がある。

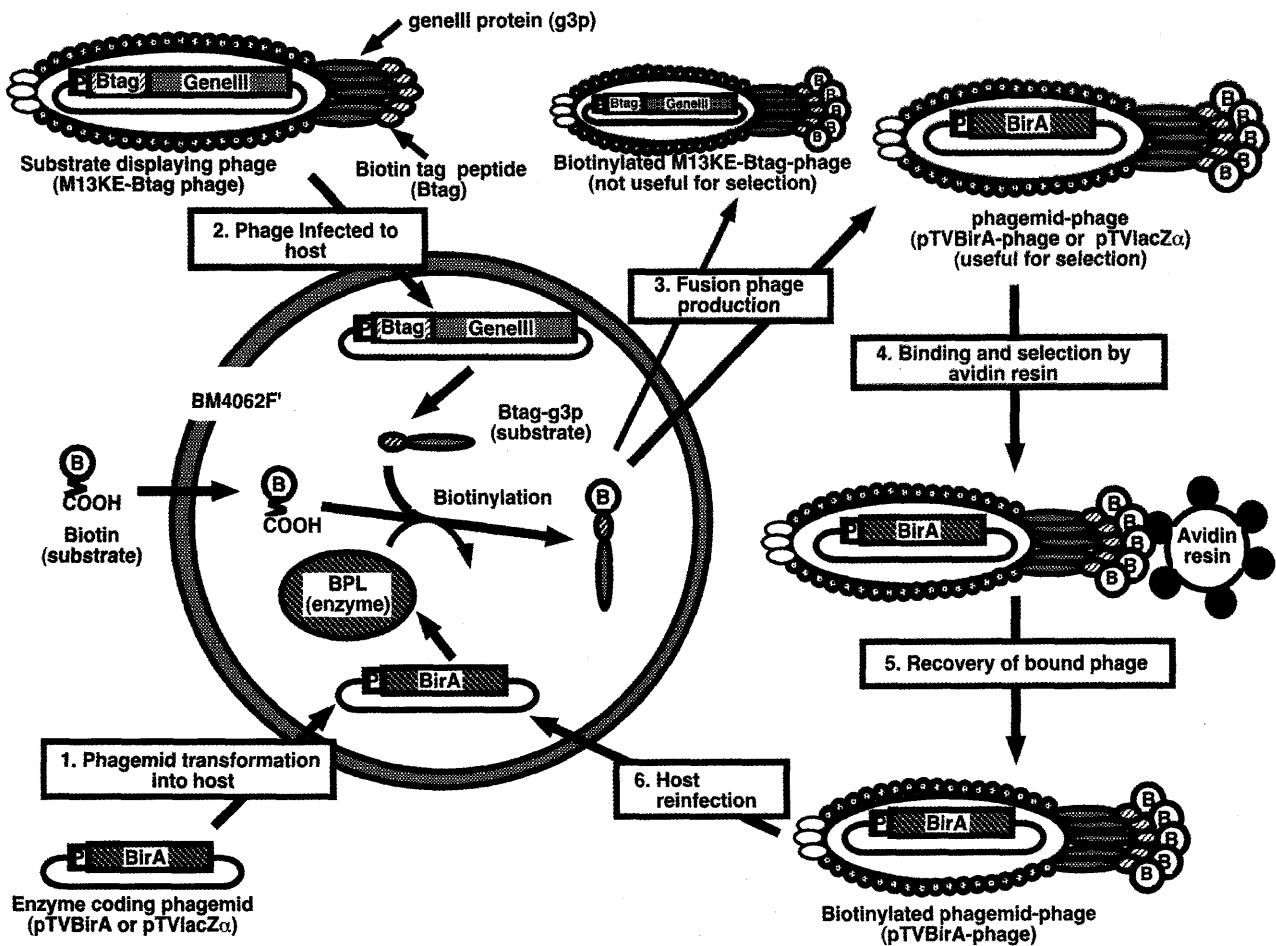
以上の背景を鑑み、私の研究では、ファージディスプレイ法を用い、酵

素分子をファージ表面に提示させずに、酵素活性を選択する系を構築する事を目的とした。

## 【実験、結果】

### 1 セレクション系の概要

酵素をファージ表面に提示させず、*in vivo* の酵素反応の生成物のみをファージに提示させる Figure 2 に示すような系を構築した。1つのモデル実験として、基質ペプチドにビオチンを付



**Figure 2** Schematic representation of the system for selection *in vivo* of an enzyme on the basis of catalytic activity and using phage display. "P" means promoter site. Selection of BPL from a pool that contains BPL and  $\alpha$ -peptide derived from  $\beta$ -galactosidase.

加する酵素 (Biotin Protein Ligase : BPL) をセレクションする事を目指した。始めに BPL の遺伝子を導入した phagemid を大腸菌に transformation し、ビオチンを含む培養液で培養し、その後、ファージを感染させる。このファージは capsid protein の 1 つである g3p タンパク質に BPL が認識する基質ペプチド配列 (Btag) を融合して発現するように改変してある。大腸菌の細胞質で、phagemid から BPL が発現すると、ビオチンがファージから発現する Btag に付加され、結果として g3p-Btag-ビオチン融合分子が生成する。この大腸菌から分泌されたファージ表面には Btag を介してビオチンが提示される事になるため、このファージをアビジンとのアフィニティーを利用してセレクションする事により、BPL 活性を有する遺伝子 (BirA) をセレクションできることになる。

## 2 Phagemid、ファージ、宿主大腸菌の構築

Phagemid に導入する BirA 遺伝子は、大腸菌 ER2738 から PCR 反応を用いて増幅した後、phagemid ベクター (pTV118N) の lac プロモーターの下流に導入した。コントロールとして lac プロモータ

一制御下で lacZ  $\alpha$  を発現する pTV118N を用いた。以下ではそれぞれの phagemid を、発現する酵素名をとって、それぞれ pTVBirA と pTVlacZ  $\alpha$  と記す。

ファージの g3p タンパク質の N 末端側に Btag (GLNDIFEAQKIEWH) ペプチドを発現するように、ファージ (M13KE) を改変した (M13KE-Btag)。14 アミノ酸からなる Btag は *in vivo* でのスクリーニングによって BPL の最小基質ペプチドとして報告されたものを用いた。

大腸菌内在性の BPL が phagemid から発現する BPL と同じビオチン付加反応を触媒するため、セレクション効率を考慮し、BPL 活性が抑制された大腸菌変異株 BM4062 に、ファージ感染に必要な F'プラスミドを導入した BM4062F' を作製した。

### 3 分泌ファージ表面のビオチン化確認

g3p はシグナル配列により合成後、大腸菌内膜に輸送される。このため、今回のセレクションの実現のためには、BPL によるビオチン化が輸送前、或は輸送中になされなければならない。そこで、始めに BPL によるビオチン化を調べた。

BM4062F' を LB 培地で培養し、対数増殖期に M13KE-Btag を感染させ、分泌された phagemid を内包するファージ粒子、phagemid-phage を精製した。*in vitro* で精製 phagemid-phage をアビジンビーズと混合し、ビーズに結合しない phagemid-phage を除去後、高濃度のビオチンを含む溶液で phagemid-phage を回収した。このアビジンによる選択前後の phagemid-phage の量を調べる事により、表面がビオチン化している phagemid-phage の割合を求める事が出来る。非特異的な結合によりビーズに結合して

いるファージを調べるために、ファージと高濃度ビオチン溶液をあらかじめ混合し、アビジンビーズに混合する実験も並行して行った。その結果、pTVBirA-phage はアビジン選択前に対して 17% 回収されたのに対し、pTVlacZ  $\alpha$ -phage の回収率は 2% (pTVBirA-phage に対して 12%) であった (Figure 3)。アビジンビーズに対して非特異的に結合している phagemid phage の量に比べて pTVlacZ  $\alpha$ -phage の回収率が高いことも分かった。これらの結果から、phagemid から発現した BPL によって、意図したように Btag へのビオチン付加が起こっているが、内在性の変異体 BPL によってもビオチン化が触媒される事が示された。

### 4 BirA 遺伝子の選択的増幅の確認

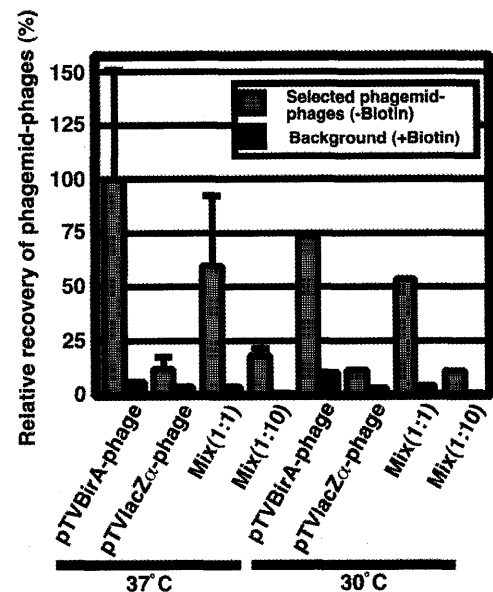


Figure 3 The efficiency of recovery of individual phagemid-phage. Results are averages of results from two or three independent experiments.

Phagemid 由来の BPL によって分泌 phagemid-phage の表面がビオチンされることが分かったので、セレクションにより、BirA 遺伝子を濃縮できるか調べた。pTVlacZ  $\alpha$  で形質転換した BM4062F' と pTVBirA で形質転換した BM4062F' を 1:1、及び 10 : 1 で混合し、M13KE-Btag を感染させた。分泌された phagemid-phage 及び、アビジンビーズで選択した後の phagemid phage が内包している phagemid をコロニー-PCR で調べた。その結果、1:1、10:1 いずれの割合で混合した場合でも、BirA を有する phagemid、pTVBirA をアビジンを用いて 2.5 倍から 10 倍の効率で濃縮できる事が分かった。

#### 【考察】

上で述べた系を用いて、モデル酵素 BPL をコードする遺伝子 BirA を 1 サイクルのセレクションにより、数倍濃縮できる事が示せた。BPL 活性は大腸菌の生存に必須であり、BPL 活性を完全に抑制した大腸菌変異株を使えないため、内在性変異 BPL 活性の影響で、バックグラウンドが高くなり、酵素遺伝子の濃縮効率が比較的低いものとなった。この問題は大腸菌に存在しない活性を持つ酵素を選択する場合、及び、酵素活性を完全に抑えた変異株を利用できる大腸菌の酵素をセレクションする際は回避できる。

今回の系はこれまでのファージディスプレイ法を用いた酵素活性セレクション法と比較して、次のような特徴を有している。1) 酵素を分泌する必要がないこと、M13 ファージが大きなサイズの phagemid を内包する事ができるため、大きなサイズの酵素を選択する事ができる。2) 1)と同じく酵素の提示が不要であるため、いくつかのサブユニットから構成される複合体酵素、特にサブユニット間の結合が弱い複合体酵素の選択に有利である。3) 酵素反応は大腸菌内という 1 つのコムパートメント内で完結するため、ファージ表面に提示された生成物はファージに内包されたファージミド由来の酵素によって触媒されたものであることが、保証されている。

本手法を用いる事によって acetylase, kinase, phosphatase などのタンパク質修飾酵素や protease など様々な酵素をセレクションすることが可能である。上で述べた特徴により、新たな触媒活性を持つ酵素を創製するのみならず、cDNA ライブラリーから目的の活性を持った酵素を探索し、細胞内の未知の酵素、酵素のネットワークを明らかにする際の強力なツールとなりうると思う。