

審査の結果の要旨

氏名 多木 崇

特定の分子に結合能を有するタンパク質をセレクションにより得る研究は、近年盛んに行われている。本研究は、単に結合能にとどまらず、機能として酵素活性を有するタンパク質をセレクションするという、これまで有効な手段のなかった試みに対して、1つの有力なシステムを構築したことに關するものである。

タンパク質のセレクションに必須となっている、表現型と遺伝子型をファージ等を介して連結する手法が開発されて以来、タンパク質ライブラリーからアフィニティーセレクションを行う事によって、様々な分子に、特異的に強く結合するタンパク質を得る試みがなされてきた。その結果、これまでに抗体分子を中心に、有用なタンパク質が数多く報告されている。近年になり、タンパク質を、結合能ではなく、酵素活性に基づいてセレクションする試みが始まっている。これまでに、バクテリオファージに酵素を提示させて、*in vitro* で酵素反応遷移状態類似体に対するアフィニティーでセレクションを試みた例や、酵素反応の生成物をファージに連結させる試みがなされているが、活性を持つ酵素を提示する事など、いくつかの問題点があり、未だ有効な手法が確立されていない状況である。

本研究では、全く新しい発想に基づき、酵素反応を大腸菌内で行わせ、酵素反応の生成物をファージに提示させ、*in vitro* で生成物に対して、従来のようにアフィニティーセレクションを行っている。このようなアプローチをとる事で、酵素分子をファージ表面に提示させる必要がなくなり、セレクションで得られた、ファージに内包された遺伝子を調べる事によって、結果的に酵素活性を持つタンパク質の遺伝子情報を手にする事が出来る。

筆者はモデル系として、ビオチンを基質ペプチドに付加する Biotin Protein Ligase (BPL) をコードする遺伝子である *BirA* を、BPL 活性を持たないコントロールタンパク質をコードした遺伝子との混合ライブラリーからセレクションする事を試みている。適切な条件検討の結果、大腸菌内で、BPL (またはコントロールタンパク質) を発現させ、キャプシドタンパク質に融合した形で発現するペプチド (Btag)、ビオチン分子を基質としたビオチン付加反応が起こり、分泌ファージ表面に Btag を介してビオチンがファージ表面に提示される事を確認している。そして、混合ライブラリーを用いた場合、分泌されたファージをアビジン、ビオチンの相互作用を用いた *in vitro* セレクションを行う事により、セレクション前後で、*BirA* 遺伝子を数倍から 10 倍ほど濃縮する事に成功している。

今回のモデル系では本論文中にも記載の通り、大腸菌由来の酵素を用いたため、内在性の BPL

活性による Btag のビオチン化が起こっており、*BirA* 遺伝子の濃縮効率はさほど高くはない。しかし、この系を exogenous な酵素活性を持つタンパク質のセレクションに用いれば、濃縮効率の高いセレクションが期待できることから、この系の有するポテンシャルは高いと考えられる。また、筆者は、M13 ファージのキャプシドタンパク質のうち、ファージ粒子 1 つ当たりのコピー数が大きく異なる 2 種類 (p3、p8) に Btag を融合させており、生成物提示量の違いを調べている。その結果、ファージ粒子 1 つあたり約 2700 コピー数の、p8 の一部にビオチンを提示させる系 (8 + 8 系) を用いた場合、ファージ粒子 1 つあたり 3 ~ 5 コピーの p3 にビオチンを提示させる系を用いた場合に比べて約 6 倍のビオチンを提示できる事を示している。モデル系ではビオチンを提示したファージをアビジンでセレクションしているため、提示量の違いによるセレクション効率の違いは見られていない。しかし、酵素反応の生成物とセレクションで用いる抗体等の分子との相互作用が弱い場合は、酵素活性が弱い時には、基質の濃度が高い p8 に生成物を提示させる系を選択する等、2 つの系を使い分ける事が可能になり、幅広い酵素活性のセレクションに用いる事が出来ると考えられる。

本論文で構築に成功した系はタンパク質を提示する必要がないため、サイズの大きな酵素、複数のサブユニットからなる酵素などをセレクションする際に特に有効と考えられる。具体的には本論文の結言にも記載があるように、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などタンパク質修飾酵素、またタンパク質切断酵素などのセレクションに応用が期待できる。このシステムは、cDNA ライブラリーから機能未知の酵素を同定するという、ポストゲノムの重要なツールとして用いる事が出来るとともに、人工的に新たな酵素活性をもつタンパク質の創製に応用する事も出来るものになっている。

本論文は、セレクションを行い、新規の酵素を得るには至らなかったが、構築した系は独創性に富み、モデル実験の結果から、非常に高いポテンシャルを持っている事が分かる。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。