

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 朱 博

論 文 題 目

Development of activity-based ultra- high-throughput  
screening system of peroxidase by using bead display

(ビーズディスプレイ法を用いたペルオキシダーゼの超高速スクリーニング系の開発)

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	中 野 秀 雄
委 員	名古屋大学教授	吉 村 徹
委 員	名古屋大学教授	小 林 哲 夫
委 員	名古屋大学准教授	岩 崎 雄 吾
委 員	名古屋大学助教	兒 島 孝 明
委 員	名古屋大学助教	Jasmina Damnjanovic

## 論文審査の結果の要旨

朱博は、産業用酵素の有用変異体のハイスループットスクリーニング技術の開発を目的とし、無細胞タンパク質合成系とエマルジョン内での生化学反応を駆使した、新規のスクリーニング技術を開発した。以下にその要旨を記載する。

過酸化水素を基質として様々な化合物の酸化反応を触媒する西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)アイソザイム C1a は、ファインケミカル合成、医療診断、バイオリミディエーション等の分野で広く利用されている産業用酵素の一つである。ビーズディスプレイ法は、本研究室で開発されたエマルジョン PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた *in vitro* タンパク質スクリーニングシステムである。このビーズディスプレイ法を用いて HRP C1a を含むペルオキシダーゼの新規ハイスループットスクリーニングシステムの構築を目指した。

ジスルフィド結合を保持する HRP C1a は組み換えタンパク質として発現することが困難とされている。そこでまず第2章では、無細胞タンパク質合成系を用いた HRP C1a の発現条件の最適化を試みた。ジスルフィド結合の架け替えを触媒する DsbC の添加、ヘミン、カルシウムイオン濃度及び反応温度について詳細な検討を行い、可溶性画分に HRP を高効率に発現させる条件の確立に成功した。

第3章では、フローサイトメトリーを用いたマイクロビーズ上での HRP 活性解析法を検討した。チラミドは、ペルオキシダーゼの作用により近傍のチロシンなどの芳香族アミノ酸残基に共有結合する化合物である。HRP C1a をマイクロビーズ上に固定化し、このチラミドに蛍光標識を施したフルオレセインチラミドを基質としてマイクロビーズ上で反応を行った。フローサイトメトリーを用いてビーズ複合体の蛍光強度を解析したところ、HRP C1a を固定化したビーズ複合体でのみ、優位な蛍光シグナルが観察された。

第4章では、DNA 結合タンパク質を介した HRP C1a をマイクロビーズ上により安定に固定化する手法を検討した。Single chain Cro (scCro) はラムダファージ由来の転写因子 Cro 二量体をリンカーによって融合された人工タンパク質であり、その結合コンセンサス配列 OR consensus DNA (ORC) との高い親和性を保持する。この scCro と HRP C1a の融合タンパク質を無細胞タンパク質合成系によって発現させたところ、scCro を HRP C1a の N 末端、C 末端いずれに付加した場合においても、その可溶性発現量の著しい改善が見られた。次に、これら scCro 融合 HRP C1a を無細胞タンパク質合成系によって発現し、ORC を予め固定化したマイクロビーズと混合することでこれを固定化した。ビオチン化チラミドを基質として HRP アッセイを行い、Cy5-ストレプトアビジンを用いて蛍光標識を施した後、フローサイトメトリーを用いてビーズ複合体の蛍光強度を解析した。その結果、scCro を HRP の N 末端、C 末端いずれに付加した場合においても、有意な HRP 活性が検出された。

さらに、C末端に scCro を保持する活性型 HRP 及び非活性型 HRP を無細胞タンパク質合成系によって発現し、ORC を介してマイクロビーズ上で固定化した後、これらビーズ複合体を 1:100 で混合した。このビーズライブラリーに対して HRP アッセイを行い、FACS を用いて蛍光を有するビーズ複合体を分取した。PCR によってビーズ上に固定化した DNA を回収し、その解析を行ったところ、活性型 HRP 遺伝子の有意な濃縮が確認された。

第 5 章では、W/O エマルジョン内での HRP 活性測定法の最適化を行った。種々の W/O エマルジョン内でペルオキシダーゼの蛍光基質の一つ、Amplex Red を基質として HRP 反応を行った。その結果、界面活性剤 SunSoft No.818SK を 3% (w/v) 含むヘキサデカン油相として用いた液滴において、最も顕著な蛍光シグナルが観察された。さらに、エマルジョン PCR の条件を検討し、HRP C1a 遺伝子を含む 1700 bp の鋳型 DNA を従来法に比べ高効率に増幅固定化する条件を確立した。

第 6 章では、転写因子 scCro を用いた無細胞タンパク質合成系中の鋳型 DNA 安定化法について述べる。線状鋳型 DNA の両端に ORC を付加し、scCro を結合させることによってヌクレアーゼによる分解の低減を試みた。その結果、scCro を固定化した鋳型を用いた場合、GFP 合成量の著しい向上が確認された。この手法を用いることにより、無細胞タンパク質合成系における様々なタンパク質の合成効率の改善が期待される。

以上のように朱博は本研究において、代表的な酸化還元酵素である西洋わさびペルオキシダーゼを題材に、その無細胞タンパク質合成系による活性体合成法を確立し、エマルジョン内での合成法の最適化を行い、機能を指標としたこれまでに無いハイスループットなスクリーニング手法を開発した。また DNA 結合タンパク質を酵素の自律的配置技術や無細胞タンパク質合成系の効率化に応用した。

本研究によって得られた成果は、今後の酵素の科学およびその応用技術に寄与するところが大きい。よって本委員会は本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。