

YLBS によるペプチドライブラリーの作成と利用

Construction and Application of Peptide-Library Generated by YLBS

小林 輝章¹、榑崎 真介²、木下 保則²、根本 直人¹、福島 秀郎¹、
西垣 功一^{2*}

Teruaki Kobayashi¹, Shinsuke Narasaki², Yasunori Kinoshita²,
Naoto Nemoto¹, Hideo Fukushima¹, Koichi Nishigaki^{2*}

¹株式会社ジェンコム 研究開発部

Department of Research and Development, GenCom Co., Ltd.

²埼玉大学 工学部 機能材料工学科

Department of Functional Materials Science, Saitama University

Abstract

Peptides have a big potential to be used for biologically active molecules such as hormone, antibiotics, inhibitors and others. Therefore, they are one of the most important substances targeted by Evolutionary Molecular Engineering. The possibility of building peptide-coding DNA libraries, beginning from 20 species of amino acid-monomer blocks, by use of YLBS technology was examined. Three/ four steps of Y-ligation were performed, providing Y³/Y⁴ DNA libraries corresponding to peptides of 8-mers/16-mers, respectively. Y³ was confirmed to be really successful in containing the whole set of 8mers. Tenacious problems of deletion and uneven appearance of blocks were challenged and fruitfully solved by introducing an operation which does not depend on the second-strand cutting of DNA by restriction enzymes or by starting with preferential blocks for T4 RNA ligation.

Key words: Y-ligation, block shuffling, evolutionary protein engineering, peptide

1. 研究の目的

汎用性の高い分子組換え法である YLBS 法 (Y 連結ブロックシャフリング法)

* 〒338-8570 さいたま市下大久保 255

電話 & FAX: 048-858-3533

e-mail: koichi@fms.saitama-u.ac.jp

を利用して、20 種のアミノ酸に対応するトリヌクレオチドブロックを出発材料として、任意のアミノ酸配列成分を含有するペプチドライブラリーの作成を目指した。合成されたライブラリーは原理的には、終止コドンを含まず、タンパク質合成系のコドン使用頻度を考慮したものと

しうる長所を持つ。数 100 アミノ酸残基のタンパク質のライブラリーを迅速合成できる魅力ももっている。方法は、ライブラリーではなく単一ポリペプチド鎖合成にも応用できる。

2. 研究の背景

分子進化の工学において、分子多様性の創出、分子の淘汰および増幅は基本重要過程である。とりわけ、初段の多様性分子集団は次段の淘汰過程（換言すれば配列空間歩行）の進め方(歩行法)に重要な影響をもち、進化の速度を規定している。工学的には極めて重要な過程である。既に、西垣らは点突然変異の集積としてのランダム配列からなるライブラリーではなく、ブロックシャufflingによるライブラリーの重要性とその合成法を提唱してきた[1-3]。ここで、呈示された Y L B S 法が 1 アミノ酸を単位とし、20 種のアミノ酸全体を原料とする一般的ペプチド配列合成にも有効であるか否かの技術点に注目が集められていた。今回は、生理活性との関係で多くの関心が寄せられているペプチド研究のための DNA ライブラリー構築を行った。

3. 結果と検討

研究は 20 種アミノ酸を出発ブロックとして用いるためのシャuffling・デバイス・コンストラクトの検討から始められた。既に、植崎らが検討していた 7 種アミノ酸ブロックの場合のコンストラクトを少し改変したもので機能することが確認された (Fig.1 参照)。これらを用いて、3 段の Y 連結と、続いて 4 段の Y 連結を行って Y³, Y⁴ DNA ライブラリーを得た。これらを塩基配列解析した結果、少なくとも Y³ までは全要素を含有するライ

```
5' Half: GGCTCGCGAATACTGCGAAGACCACCATGNNN
3' Half: NNNGATCTCACTCCTTCGCGAGTATTGCGGAGCC
```

Fig. 1. Shuffling device constructs for 20 species amino acid blocks. Each half (5' and 3') contains the coding region shown by NNN.

ブラリーであると推定された。

さらに、本研究では欠失と出現頻度偏りの問題に直面し、これらを解消する方法を検討した。欠失問題については、使用する制限酵素の特性を踏まえた方式(即ち、厳密性のやや劣る 2 本鎖 DNA の第 2 鎖の切断に依存しない方式)を採用し、問題を解消した。偏り問題についても、出発のブロック配列を吟味することで(それは、選択自由度をさげることになり、幾分後退ではあるが)、基本的に回避しうることを確認した。

4. 参考文献

- [1] K. Nishigaki, H. Kyono, Y. Kinoshita, and Y. Husimi: "Development of a Sequence-space Hopping Method for Evolutionary Molecular Engineering", *Seibutu-buturi*, 34, p. S173 (1994)
- [2] K. Nishigaki, Y. Kinoshita, and H. Kyono, "Restriction-Enzyme-Nondependent Recombination and Rearrangement of DNA (RRR)", *Chemistry Lett.*, 1995, pp. 131-132 (1995)
- [3] K. Kitamura, Y. Kinoshita, S. Narasaki, N. Nemoto, Y. Husimi, and K. Nishigaki.: "Construction of block-shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering: Y-ligation-based block shuffling (YLBS)", *Protein Engineering*. in press (2002).