進化分子工学における大規模遺伝子配列解析を利用した機能タンパク質の探索

(東北大院工 [1]・東北大院情 [2]・お茶大基幹研 [3]・産総研 AIRC[4]・理研 AIP[5]・東大院新領域 [6])
○河田 早矢 [1]・伊藤 智之 [1]・西 羽美 [2,3]・来見田 遥一 [4]・グエン・トゥイ・ズオン [4]・中澤 光 [1]・齋藤 裕 [4,5]・亀田 倫史 [4,5]・津田 宏治 [5,6]・梅津 光央 [1,5]

Discovery of functional proteins from a library by next-generation sequencing analysis

([1]*Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.*, [2]*Grad. Sch. Information Sci., Tohoku Univ.*, [3]*Fac. Core Res., Ochanomizu Univ.*, [4]*AIRC, AIST*, [5]*Adv. Intell. Pro., RIKEN*, [6]*Grad. Sch. Frontier Sci., The Univ. of Tokyo*)
○Sakiya Kawada[1], Tomoyuki Ito[1], Hafumi Nishi[2,3], Yoichi Kurumida[4], Thuy Duong Nguyen [4],Hikaru Nakazawa[1], Yutaka Saito[4,5], Tomoshi Kameda[4,5], Koji Tsuda[5,6], Mitsuo Umetsu[1,5]

Library approach of creating a huge number of variants and screening to identify desirable variants is used for generating proteins with functional properties. However, the limitation of the number which can be screened makes it difficult to identify appropriate variants. In this study, we propose a method for finding desirable variants from a library by next-generation sequencing analysis.

We constructed the M13 phage library displaying the antibody fragments where CDRs were randomized and four rounds of panning were performed. After the selection, we performed next-generation sequencing analysis for each selected phage pool at each round of the selection process, and the changes of sequence diversity after the selection was analyzed. This result showed that some phages were enriched during the selection process and we identified the positively-binding phages in the enriched phage pool by ELISA.

Keywords : Directed Evolution; Next-generation Sequencing

タンパク質の機能改変・創出には、変異導入により作製したタンパク質群から目的の機能を有するタンパク質をスクリーニングする進化分子工学が用いられる。しかし、作製できる変異体群に比較して機能評価を行える変異体数はわずかであるため、目的の機能変異体を取得できない場合がある。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いた大規模配列解析により、変異体群中から目的機能変異体を発見する方法を提案する。

相補性決定領域(CDR)にランダム変異導入した抗体断片提示 M13 ファージライブラリーを作製し、標的分子に対する結合選択操作を 4 回行った。選択操作後、各選択操作後ファージ群に対して次世代シーケンサー解析を行い、選択操作過程で生じるファージ群の分布変化を評価した。その結果、一部のファージが結合選択操作により濃縮していることが分かり、ELISA による結合力評価を行うことで濃縮していたファージ群中から標的分子に結合陽性を示す変異体を発見した。

© The Chemical Society of Japan