

特集：無細胞生命科学の創成

無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学システムの構築と応用

兒島孝明¹, 中野秀雄²

近年, DNA 分子が持つ遺伝情報とそこから合成されるタンパク質分子を関連付ける手法として, 無細胞タンパク質合成系を用いた様々な技術が開発されてきている. 代表例として, リボソームを介するリボソームディスプレイ, mRNA とタンパク質を直接結合させる mRNA ディスプレイ (*in vitro virus*), エマルジョンを用いる IVC 法, マイクロプレート上で関連づける SIMPLEX 法などがあり, 高親和性を有する抗体やペプチド等の選択, 酵素活性の向上, 基質特異性の改変, 安定性の増大など, 主に進化分子工学的目的に利用されてきている. 本稿では進展著しいこれらの技術を概説し, 最近の応用例を紹介する.

1. はじめに

タンパク質は多様な物質変換や複雑な情報伝達を行う生体高分子であり, そのアミノ酸配列は DNA で記述されている. したがってどのようなタンパク質であれ, そのアミノ酸配列を合成することは, 対応する DNA 配列を合成することで可能になる. しかしながらそのアミノ酸配列が形成するタンパク質の高次構造と, さらにはその機能とを正確に予測し, 設計することは, 現時点での我々の知識では困難である. そこで目的の構造や機能を有するタンパク質分子を創り出すためには, 進化分子工学という手法が有効である. 出発分子として自然界に存在するタンパク質を用いる場合もあれば, 全く人工的に作製した分子を用いる場合もあるが, いずれにせよそのようなスカフォールド分子を元にして, それらにランダムな変異を導入したライブラリーを構築し, 特定の機能を指標としたスクリーニングあ

るいはセレクションを行い, 目的とした分子に人工的に進化させるのである.

この目的のため, DNA 分子とそれがコードするタンパク質分子とを, 生物学的あるいは物理的に関連づける技術が開発されてきた. 生細胞を用いて関連づける技術の代表的例としては, ファージや細胞の表面にタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイ, 細胞表層ディスプレイなどがあり, これまで様々な機能分子の創製技術として利用されてきている. 一方, 生きた細胞を用いずに関連づけを行い, 無細胞タンパク質合成系を用いて DNA が有する遺伝情報をタンパク質に変換する, 無細胞系でのディスプレイ技術が注目されてきており, これまでリボソームディスプレイ, mRNA ディスプレイ (*in vitro virus*), STABLE, *in vitro compartmentalization* (IVC), マイクロビーズディスプレイ, SIMPLEX などが開発されている. いずれも生細胞系と比べて, 取り扱える分子数が大きいことや, 細胞の有する様々な制約を外すことができるなどの様々な利点がある. 以下にその原理と応用例を紹介したい.

2. リボソームディスプレイ法

リボソームを介する複合体 (リボソーム複合体) を用いた無細胞系ディスプレイシステムは, まずペプチドライブラリー選択法として 1994 年, Mattheakis らによって初めて報告された¹⁾. その後, Hanes と Plückthun は, ジスルフィド結合を保持する単鎖抗体 (single-chain variable fragment, scFv) の選択法としてこの手法が応用できることを

¹大阪府立大学大学院理学系研究科 (〒599-8570 堺市中区学園町 1 の 2)

²名古屋大学大学院生命農学研究科 (〒464-8601 名古屋市千種区不老町)

Development and application of evolutionary molecular engineering systems using cell-free protein synthesis

¹Takaaki Kojima (Graduate School of Science, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8570, Japan) and ²Hideo Nakano (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan)

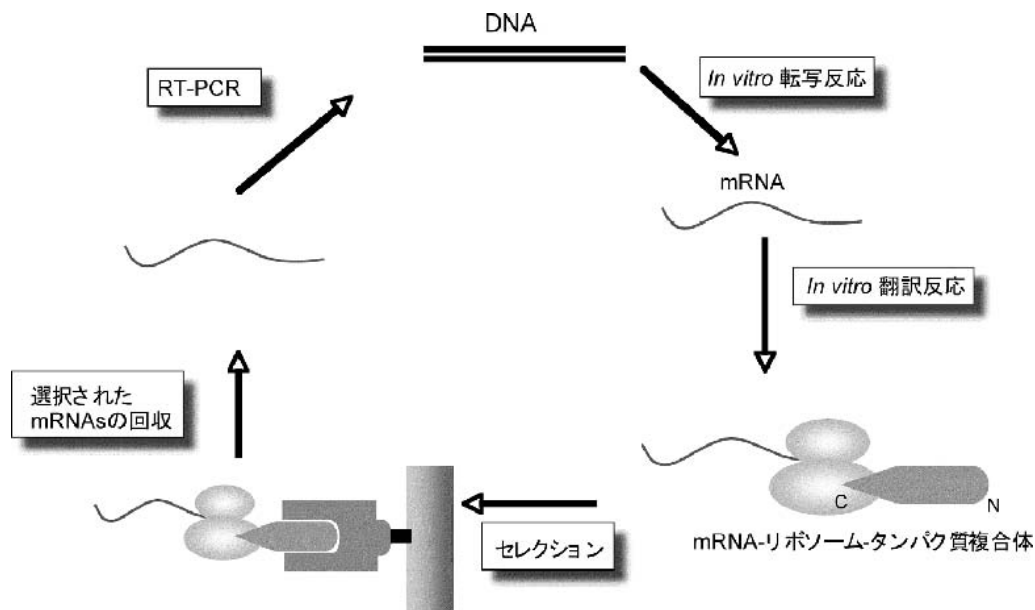


図1 リボソームディスプレイ法

実証し、現在広く用いられているリボソームディスプレイシステム（図1）を事実上確立した²⁾。すなわち終止コドン欠 mRNA を用いることにより、試験管内で mRNA-リボソーム-タンパク質の複合体を形成させ、mRNA（遺伝子型）とタンパク質（表現型）とを、リボソームを介して関連づけるのである。通常、翻訳されたペプチドとリボソームとの解離は、mRNA 上の終止コドンに結合する解離因子群（release factors, RFs）によって触媒される。そのため、もし翻訳を行う mRNA 上に終止コドンが存在しないならば、この RFs の結合が起こらず、合成したペプチドを抱えこんだリボソームが mRNA 上で「立ち往生」することになる。その結果、mRNA-リボソーム-タンパク質複合体が形成される。主な手順は以下の通りである。まず、転写反応により終止コドンが存在しない mRNA を作成する。なお、翻訳産物をリボソームの外側にディスプレイするため、転写反応の鋳型となる DNA の 3' 末端側にスペーサーと呼ばれるペプチド配列コード領域を付加しておくのが一般的である。次に mRNA を鋳型とした翻訳反応を、大腸菌²⁾、ウサギ網状赤血球³⁾、コムギ胚芽⁴⁾抽出液を用いた無細胞系で行う。次いで、生成したリボソーム複合体に対するアフィニティセレクションを行い、選択された複合体から結合したタンパク質をコードする mRNA を回収し、RT-PCR によって目的とする DNA を獲得する。なお、このステップにおいて、PCR による変異導入を行うことも可能である。以上の手順を繰り返すことで、ある特定のリガンドに対して高い親和性を有するタンパク質を得ることができる。解析可能なライブラリーサイズは 10^{12} /ml と非常に大きい⁵⁾。この手法を用いて、現在までに、抗体^{2,6-8)}、リガンド結合タンパク質^{9,10)}、ペプチド¹¹⁾、

酵素^{4,12)}などを対象とした成功例が報告されている。また近年、ファージディスプレイを3ラウンド行ったライブラリーに対し、error-prone PCR を組み合わせたリボソームディスプレイを用いてさらなるスクリーニングを行い、ファージディスプレイを用いた場合よりもより親和性の高い scFv（抗ウシンスリン、 $K_d=152\text{pM}$ ）の獲得に成功している¹³⁾。この結果はリボソームディスプレイを用いたセレクション系の有効性、将来性を示す最も端的な例の一つと言えよう。

3. mRNA ディスプレイ (*in vitro virus*) 法

ピューロマイシンはリボソームで翻訳されているペプチドの末端に結合し、その合成を停止させ、菌の生育を阻害する抗生物質である。これを利用して mRNA（遺伝子型）とタンパク質（表現型）をリンクさせる技術が mRNA ディスプレイ法 (*in vitro virus* 法) である。この手法は 1997 年、二つの研究グループによってほぼ同時期に報告された^{14,15)}（図2）。基本骨格は先に挙げたリボソームディスプレイ法と類似しているが、幾つかの相違点がある。3' 末端にピューロマイシンが結合した mRNA を鋳型とした無細胞翻訳反応を行うと、そのピューロマイシンがリボソームの P サイトにあるペプチド鎖と反応し、mRNA-ピューロマイシン-タンパク質の複合体ができる。この複合体は mRNA とタンパク質が共有結合で直接リンクしているのでもリボソームディスプレイ法に比べて実験条件の制約が少ないという特徴を有する。さらにこの複合体に対し、逆転写反応を行うことで cDNA を加えた複合体を形成させることが可能である。mRNA は非常に分解されやすい物質であるため、遺伝子型を DNA に変換できることにより、

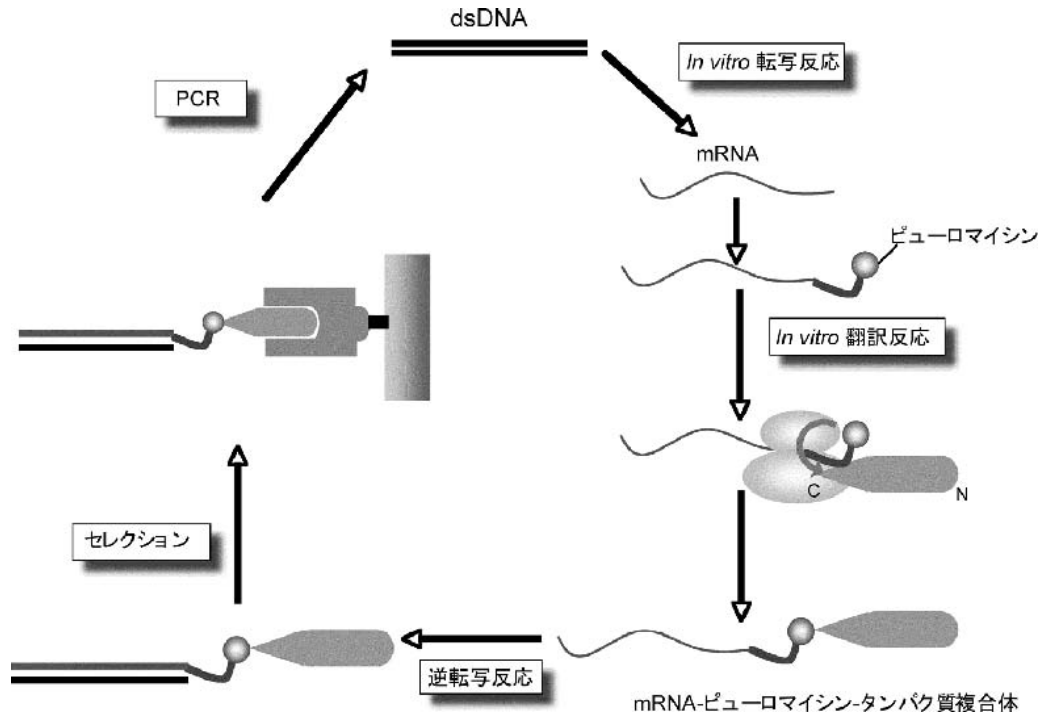


図2 mRNA ディスプレイ (*in vitro virus*) 法

実験的な取り扱いが簡便になる。

以上の理由から、mRNA ディスプレイ法はリボソーム ディスプレイ法に比べより安定した系であると言えるが、その反面 mRNA にピューロマイシンを付加させるという煩雑な操作を要する。ピューロマイシンと mRNA の 3' 末端との結合には、当初核酸-ピューロマイシン複合体をライゲーションさせる手法がとられていたが、最近ではより簡便な UV クロスリンクを利用する手法¹⁶⁾やプライマーのハイブリダイゼーションを利用する手法¹⁷⁾等も報告されている。解析可能なライブラリーサイズは $10^{14}/\text{ml}$ であり⁵⁾、ライブラリーサイズの点では先に挙げたリボソーム ディスプレイ法よりも優れていると考えられている。この mRNA ディスプレイ法を用いて、現在までにペプチド^{18~20)}、DNA 結合タンパク質²¹⁾、等の選択の成功例が報告されている。Fukuda らは、この手法を用いて K_d が野生体の約 1/30 である抗フルオレセイン scFv の獲得に成功している²²⁾。またこの手法を用いて、タンパク質間相互作用の新規網羅的解析を行った報告がなされている^{23,24)}。これらの報告は、mRNA ディスプレイ法がプロテオーム解析にも適用できるというものであり、今後の動向が注目される。

4. *in vitro* compartmentalization (IVC) 法

water-in-oil (以下 W/O) エマルジョンを用いた *in vitro* compartmentalization (IVC) 法は、Tawfik と Griffiths によって 1998 年に報告された²⁵⁾ (図 3)。この手法は、界面活性剤を加えた油相に水相を加え、攪拌することで形成される

W/O エマルジョンの水相を無細胞タンパク質合成反応の場としている。一般的に平均数 μm の水滴として反応場が区画化されるようエマルジョンを作成する。この際、1 区画あたり平均 1 分子以下となるように希釈した鑄型 DNA 溶液を無細胞タンパク質合成反応液とともに封入すると、各区画中で鑄型 1 分子由来の翻訳産物が合成されることとなり、遺伝子型と表現型が対応付けられる。現在までにメチラーゼ^{25,26)}、制限酵素²⁷⁾、DNA 結合タンパク質²⁸⁾、DNA スクレアーゼインヒビター²⁹⁾等を対象とし、系の確立及び有用改変体の獲得に成功している。また近年、この IVC 法と SELEX 法とを組み合わせ Diels-Alder 反応を触媒するリボザイムの獲得にも成功している³⁰⁾。また Cohen らはこの手法を用いてメチラーゼ *Hae* III の *in vitro* 進化を試み、メチラーゼ *Hae* III のスター活性効率が 670 倍向上し、かつ元の認識配列を含む種々の類似配列に対する触媒効率をも向上させた変異体取得に成功した²⁶⁾。これらの結果は、IVC 法の有用性を示す顕著な例であろう。

さらに、Bernath らは、W/O/W エマルジョン (double emulsion) を利用した IVC 法の開発にも成功している³¹⁾。この手法を用いれば、煩雑なエマルジョン破壊のステップを踏むことなく、分画された状態のままセルソーターによる選択を行うことが可能である。よってこの double emulsion 技術は、よりいっそう迅速なスクリーニングを可能にするだけでなく、従来の IVC 法では困難であった酵素活性や、蛍光タンパク質等のスクリーニングを可能にすると考えられている。

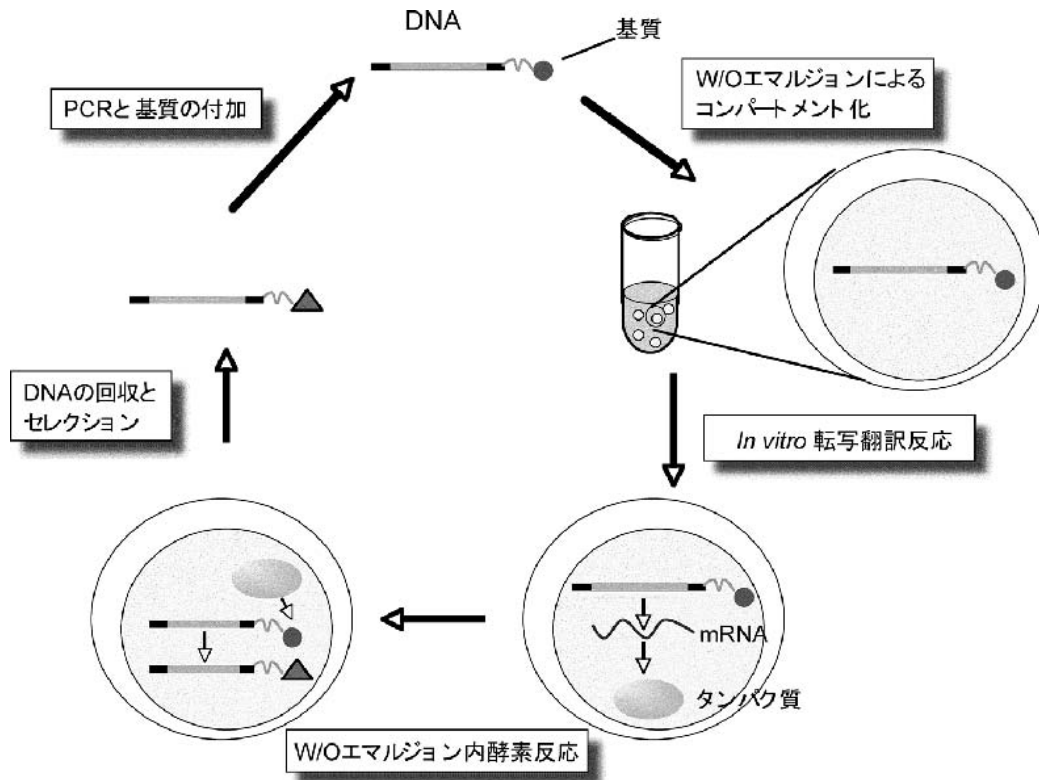
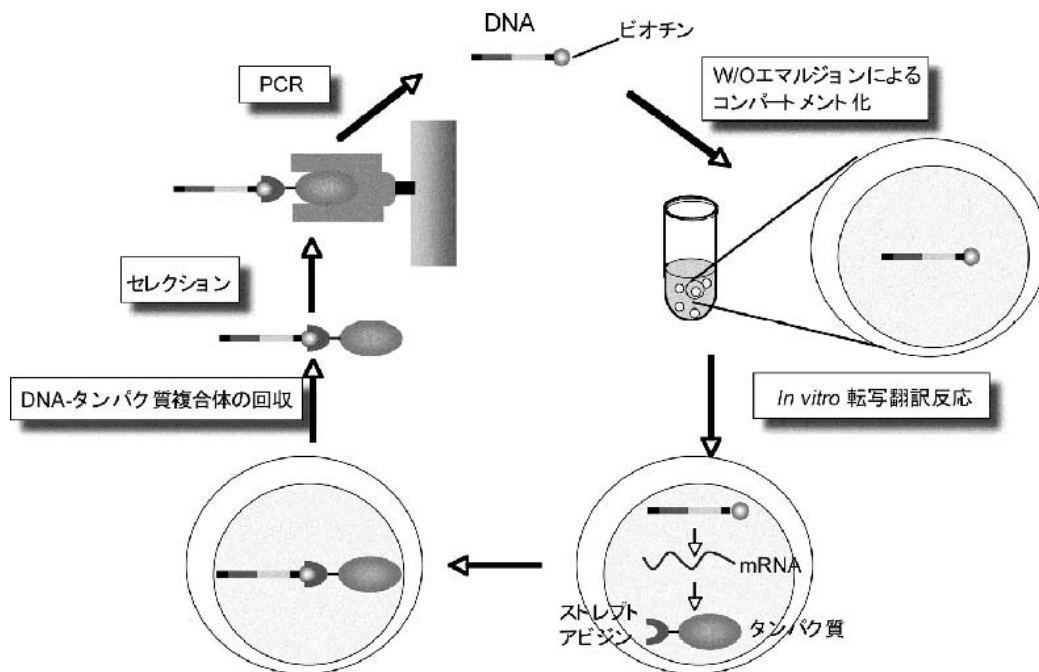
図3 *in vitro* compartmentalization (IVC) 法

図4 STABLE 法

5. STABLE (STA-biotin linkage in emulsions) 法

1999年, Doiらは先に挙げたIVC法とストレプトアビジンとビオチンの結合を利用したSTABLE (STA-biotin linkage in emulsions)を開発した³²⁾(図4)。その手順は以

下の通りである。まず、ビオチンラベルした鋳型DNAを上記のような方法で1区画あたり平均1分子以下になるように無細胞タンパク質合成反応液と共に封入する。鋳型DNAには提示したいタンパク質とストレプトアビジンの融合タンパク質がコードされており、合成される融合タン

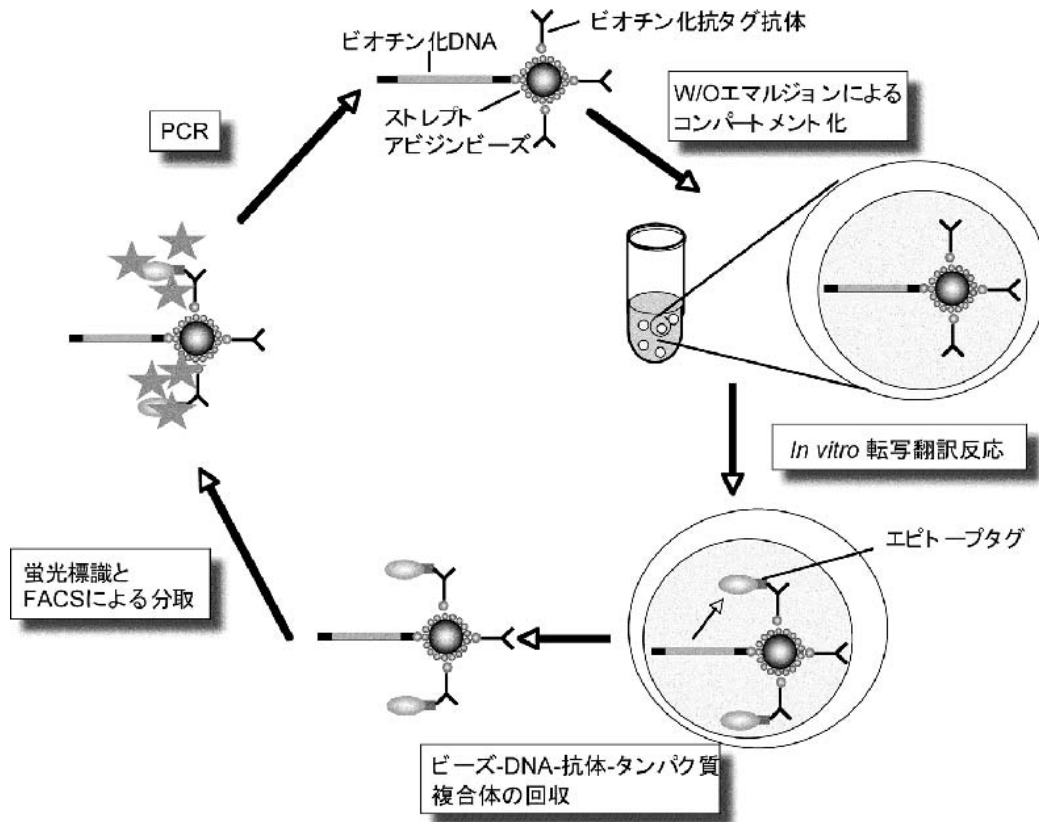


図5 IVC法を用いたマイクロビーズディスプレイ法

パク質はDNAにラベルされているビオチンに結合することとなる。この複合体に対してアフィニティセレクションをし、得られた遺伝子型(DNA)の配列解析を行う。DNAを遺伝子型として用いるSTABLE法では、リボソームディスプレイやmRNAディスプレイに比べより安定した複合体が形成されると考えられている。さらに遺伝子型と表現型(タンパク質)を直接リンクさせている点がIVCと異なり、分画を行ったエマルジョンを破壊した後もそのリンクは保持される。現在のところ、この手法を用いた報告例はペプチド^{32,33)}、タンパク質(GST)³⁴⁾の選択などに留まっているが、既に述べたように、従来のディスプレイシステムに比べてより有利な点も多いことから今後の進展が期待される。

6. マイクロビーズディスプレイ法

無細胞タンパク質合成系とマイクロビーズを利用したディスプレイシステムは2002年、先に挙げたIVCを利用したシステムとしてSeppらによって報告された³⁵⁾(図5)。主な手順は以下の通りである。ストレプトアビジンでコートされたマイクロビーズにビオチン化したDNA(1ビーズあたり平均1分子以下)、ビオチン化された抗タグ抗体をそれぞれ固定化し、このマイクロビーズ複合体を無細胞タンパク質合成の鋳型としてIVCを行う。この際、ビー

ズ複合体を1区画あたり平均1ビーズ以下になるように加えることによって、エピトープタグを保持する1鋳型由来翻訳産物がビーズに固定化され、遺伝子型と表現型がリンクされることとなる。目的の翻訳産物が固定化されたビーズ複合体に蛍光標識を施し、セルソーターによる分取(ソーティング)を行う。この手法の特筆すべき点は、遺伝子型、表現型をそれぞれマイクロビーズに固定化することにより、セルソーターを用いたハイスループットスクリーニングを行えることである。現在用いられているセルソーターは機器間で若干の差はあるものの、1秒間に数千~数万クローンの解析が可能であり、このセルソーターを用いるシステムは、他のディスプレイシステムに比べ、よりハイスループットスクリーニングに適した系であると言える。またNordらは、W/Oエマルジョンを用いないビーズディスプレイの系も報告している³⁶⁾。さらにGriffithsとTawfikは、エマルジョン分画を2回行うことで酵素活性のアクセシビリティを可能にした手法を用いてホスホトリエステラーゼの機能改変を試み、 k_{cat} が野生型の63倍の変異体取得に成功している³⁷⁾。

一方Kojimaらは、W/Oエマルジョン内固相1分子PCRを用いてマイクロビーズ上に1分子由来のDNAを固定化する技術を開発し、この技術を用いて転写因子結合部位のハイスループット同定法を確立している^{38,39)}。この手法で

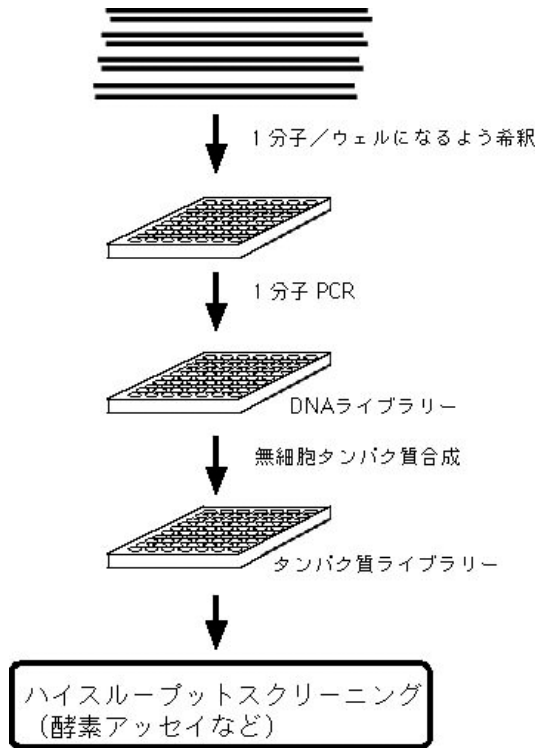


図6 SIMPLEX法

作成される“ビーズライブラリー”は1ビーズに数百分子以上のDNAが固定化されており、無細胞タンパク質合成の鋳型として用いることも可能である。よって、このビーズライブラリーをマイクロビーズディスプレイシステムに応用することで、より高効率、高感度なスクリーニングが可能になることが予想され、今後の進展が期待される。

7. SIMPLEX法

これまでの関連づけ方法は遺伝型と表現型を物理的に固定する方法であった。これらの方法ではライブラリーサイズは非常に大きくなるものの、可能なアッセイ法が限られてしまう。特に酵素において進化分子工学が必要とされるのは、耐熱性の向上であったり、基質特異性の向上であったりと様々であり、多くの場合プレート上でアッセイすることが必要である。そこで中野らの研究グループでは、DNA 1分子を直接PCRで増幅し、連続的に無細胞タンパク質合成系によりタンパク質ライブラリーをプレート上に作製する手法 (single-molecule-PCR-linked in vitro expression: SIMPLEX) を考案した。図6にその概念図を示す。すなわちDNAを希釈し、1ウェルあたり1DNA分子になるようにまき、ついでPCRによりその1分子を増幅して、マイクロプレート上でDNAライブラリーを作製し、次に無細胞タンパク質合成系を加えることで、タンパク質分子ライブラリーを構築する。DNA 1分子からの増幅過程が組み込まれているため、アッセイに用いるタンパク質を広

いレンジ幅で用意することができる。しかしながら通常用いられている96穴プレートや384穴プレートでは、10の12乗もの増幅を行わなければならない。DNA 1分子からの特異的増幅のため、当初はnested PCRとよばれる2段階のPCRを用いる必要があったが⁴⁰⁾、適切なDNAポリメラーゼの使用や1種類のプライマーを用いることで、1段階のPCRで安定に増幅する技術が確立された⁴¹⁾。

この手法で取り扱えるライブラリーサイズはPCR装置の処理能力に依存しており、現状では384穴プレートしか用いることができないことが、大きな欠点である。しかし将来的にはチップを用いたピコリットル容量の極微量PCR技術⁴²⁾を利用していくことで、10の6乗から7乗程度までのライブラリーを取り扱えるようになるのではないかと期待されている。

実際のスクリーニングにおいては、ライブラリーサイズという量的な問題以外に、その均一性という質的な観点も重要である。すなわち仮に全く同じ遺伝子が存在したとき、合成量の違いによりそれぞれの検出されるシグナルが大きく異なるようでは、真に分子あたりの活性が高いものを選択してくることは困難だからである。実際SIMPLEX法によるライブラリーの均一性は高く、そのCV(変動係数)は8%程度であった⁴³⁾。この値はピペッティング精度の5-10%とほぼ一致しており、また生細胞を用いるシステムより高い均一性を示している。

一方、限られたPCR装置のサンプル処理数を補うため、平均で5分子/ウェルになるよう分配したPCRが行われた。その結果、初発分子の分子種のパラエティは、70サイクルのPCRの後でもほとんど変化しなかった⁴⁴⁾。これは2段階のスクリーニングが可能であり、容易にライブラリーサイズを増大できることを意味している。

この技術はこれまで種々のタンパク質の機能改変に応用されており、以下にその概略を紹介する。

Burkholderia cepacia が産生するリパーゼは、耐熱性、および有機溶媒耐性にもすぐれており、また様々なエステルに対し、高い光学選択性を有する有用酵素である。Kogaらは本酵素と基質との複合体の構造モデルより、基質結合領域の疎水ポケット内の4アミノ酸残基に対し、コンビナトリアル変異を導入した変異ライブラリーをSIMPLEX法により構築し、(S)および(R)体基質を用いて、スクリーニングを行った。その結果、野生体と同等な比活性を有しながら基質に対する光学選択性が反転している変異体を数種得ることに成功した⁴⁵⁾。

Phanerochaete chrysosporium 由来マンガンペルオキシダーゼは、無塩素パルプ漂白や芳香族系環境汚染難分解性物質等の分解への応用が期待されているが、反応に必須な過酸化水素に対する安定性が低く、産業利用を困難にしている。そこでMiyazaki-Imamuraらは、本酵素の過酸化水

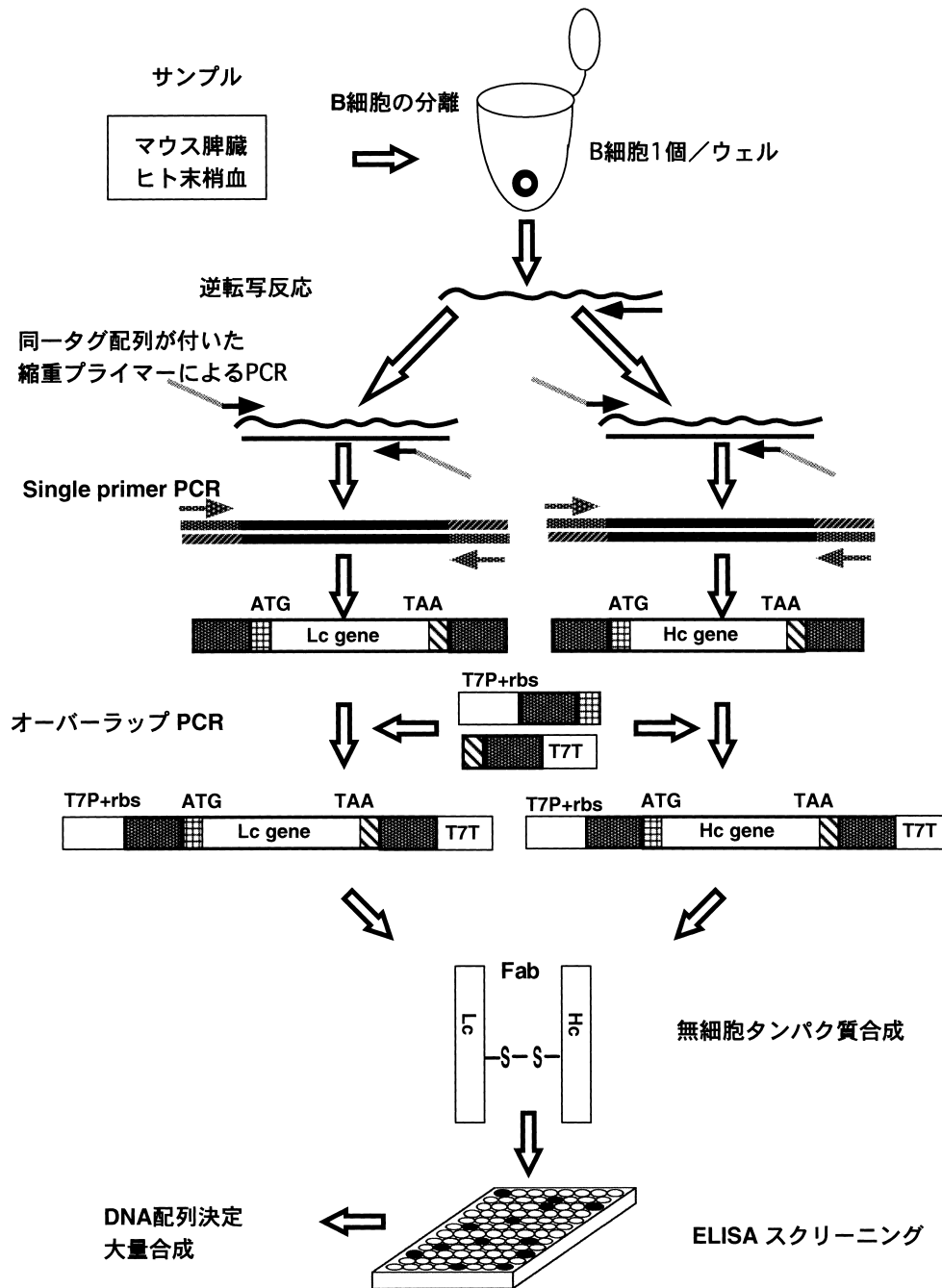


図7 SICREX法

素結合ポケットの入り口に位置する3アミノ酸残基をコンビナトリアルに置換したライブラリーをSIMPLEXにより作製し、過酸化水素耐性を指標にスクリーニングを行った。その結果野生体より約9倍耐性の向上した変異体を得ることに成功した⁴⁶⁾。

またRungpragayphanらは抗ヒト血清アルブミン結合活性の相補性決定領域に着目したライブラリーをSIMPLEX法により作製し、ELISAによりスクリーニングを行い、野生型より高い親和性を持つ変異体を得ることに成功し

た⁴⁷⁾。

8. SICREX法

JiangらはB細胞1個からRT-PCRと無細胞タンパク質合成系により抗体のFab断片を合成させることに成功し、これをSICREX (single-cell RT-PCR-linked *in vitro* expression)と名付けた(図7)。すなわち免疫したマウスより調製したB細胞1個を出発遺伝子材料として、L鎖およびH鎖のHd部分を別々に特別に工夫した逆転写反応とPCR

により増幅し、それぞれ T7 プロモーター配列, RBS, T7 ターミネーター配列を付加し、再び混合したものを鋳型として、無細胞タンパク質合成系により Fab 断片を合成し、モノクローナル抗体の取得に成功した⁴⁸⁾。さらにヒトの末梢血由来の 1 個の B 細胞を材料としても Fab の合成に成功している。今後ハイブリドーマ法に代わるモノクローナル抗体取得法としての利用が期待される。

9. 終わりに

無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学システムの利点として、1) ライブラリーサイズが大きい、2) 非天然アミノ酸を含むライブラリーを構築することができる、3) 細胞毒性を持つようなものでも選択可能である、4) 細胞を培養する必要がなく迅速な選択系が構築できる、などがあげられる。すでに米国や日本でもこれらの技術を使ったベンチャー企業が誕生しており、今後様々な機能分子が取得されていくことが期待される。

文 献

- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R., & Dower, W.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9022-9026.
- Hanes, J. & Plückthun, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937-4942.
- He, M. & Taussig, M.J. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 5132-5134.
- Takahashi, F., Ebihara, T., Mie, M., Yanagida, Y., Endo, Y., Kobatake, E., & Aizawa, M. (2002) *FEBS Lett.*, **514**, 106-110.
- Leemhuis, H., Stein, V., Griffiths, A.D., & Hollfelder, F. (2005) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 472-478.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R., & Plückthun, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14130-14135.
- He, M., Menges, M., Groves, M.A., Corps, E., Liu, H., Bruggemann, M., & Taussig, M.J. (1999) *J. Immunol. Methods*, **231**, 105-117.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., & Plückthun, A. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1287-1292.
- Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G., & Plückthun, A. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 575-582.
- Schimmele, B. & Plückthun, A. (2005) *J. Mol. Biol.*, **352**, 229-241.
- Lamla, T. & Erdmann, V.A. (2003) *J. Mol. Biol.*, **329**, 381-388.
- Amstutz, P., Pelletier, J.N., Guggisberg, A., Jermutus, L., Cesaro-Tadic, S., Zahnd, C., & Plückthun, A. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9396-9403.
- Groves, M., Lane, S., Douthwaite, J., Lowne, D., Rees, D.G., Edwards, B., & Jackson, R.H. (2006) *J. Immunol. Methods*, **313**, 129-139.
- Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y., & Yanagawa, H. (1997) *FEBS Lett.*, **414**, 405-408.
- Roberts, R.W. & Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12297-12302.
- Kurz, M., Gu, K., & Lohse, P.A. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, e83.
- Tabuchi, I., Soramoto, S., Nemoto, N., & Husimi, Y. (2001) *FEBS Lett.*, **508**, 309-312.
- Keefe, A.D. & Szostak, J.W. (2001) *Nature*, **410**, 715-718.
- Wilson, D.S., Keefe, A.D., & Szostak, J.W. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3750-3755.
- Hammond, P.W., Alpin, J., Rise, C.E., Wright, M., & Kreider, B.L. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 20898-20906.
- Tateyama, S., Horisawa, K., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Doi, N., & Yanagawa, H. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e27.
- Fukuda, I., Kojoh, K., Tabata, N., Doi, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., & Yanagawa, H. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e127.
- Horisawa, K., Tateyama, S., Ishizaka, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Doi, N., & Yanagawa, H. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, e169.
- Shen, X., Valencia, C.A., Szostak, J.W., Dong, B., & Liu, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5969-5974.
- Tawfik, D.S. & Griffiths, A.D. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **7**, 652-656.
- Cohen, H.M., Tawfik, D.S., & Griffiths, A.D. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 3-11.
- Doi, N., Kumadaki, S., Oishi, Y., Matsumura, N., & Yanagawa, H. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, e95.
- Sepp, A. & Choo, Y. (2005) *J. Mol. Biol.*, **354**, 212-219.
- Bernath, K., Magdassi, S., & Tawfik, D.S. (2005) *J. Mol. Biol.*, **345**, 1015-1026.
- Agresti, J.J., Kelly, B.T., Jaschke, A., & Griffiths, A.D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16170-16175.
- Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A.D., Magdassi, S., & Tawfik, D.S. (2004) *Anal. Biochem.*, **325**, 151-157.
- Doi, N. & Yanagawa, H. (1999) *FEBS Lett.*, **457**, 227-230.
- Yonezawa, M., Doi, N., Kawahashi, Y., Higashinakagawa, T., & Yanagawa, H. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, e118.
- Yonezawa, M., Doi, N., Higashinakagawa, T., & Yanagawa, H. (2004) *J. Biochem.*, **135**, 285-288.
- Sepp, A., Tawfik, D.S., & Griffiths, A.D. (2002) *FEBS Lett.*, **532**, 455-458.
- Nord, O., Uhlen, M., & Nygren, P.A. (2003) *J. Biotechnol.*, **106**, 1-13.
- Griffiths, A.D. & Tawfik, D.S. (2003) *EMBO J.*, **22**, 24-35.
- Kojima, T., Takei, Y., Ohtsuka, M., Kawarasaki, Y., Yamane, T., & Nakano, H. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, e150.
- Kojima, T., Yamane, T., & Nakano, H. (2006) *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 440-444.
- Ohuchi, S., Nakano, H., & Yamane, T. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4339-4346.
- Nakano, H., Kobayashi, K., Ohuchi, S., Sekiguchi, S., & Yamane, T. (2000) *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 456-458.
- Nagai, H., Murakami, Y., Morita, Y., Yokoyama, K., & Tamiya, E. (2001) *Anal. Chem.*, **73**, 1043-1047.
- Rungpragayphan, S., Kawarasaki, Y., Imaeda, T., Kohda, K., Nakano, H., & Yamane, T. (2002) *J. Mol. Biol.*, **318**, 395-405.
- Rungpragayphan, S., Nakano, H., & Yamane, T. (2003) *FEBS Lett.*, **540**, 147-150.
- Koga, Y., Kato, K., Nakano, H., & Yamane, T. (2003) *J. Mol. Biol.*, **331**, 585-592.
- Miyazaki-Imamura, C., Oohira, K., Kitagawa, R., Nakano, H., Yamane, T., & Takahashi, H. (2003) *Protein Eng.*, **16**, 423-428.
- Rungpragayphan, S., Haba, M., Nakano, H., & Yamane, T. (2004) *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **28**, 223-228.
- Jiang, X., Suzuki, H., Hanai, Y., Wada, F., Hitomi, K., Yamane, T., & Nakano, H. (2006) *Biotechnol. Prog.*, **22**, 979-988.