3G1330

タンパク質の人工設計と折り畳み可能性

○金 文珍¹、高田 彰二² (¹神戸大・自然・化学、²神戸大・理学・化学)

折り畳み研究が、[配列から構造]を問題にしているのに対して、その逆[構造から配列]の問題は人工設計研究であり、後者は折り畳み問題解決への鍵を与えると期待されている。設定した鋳型構造に対して最も適合するアミノ酸配列をまったく新規に探索する。

エネルギーランドスケープ理論によると、折りたたみ可能なタンパク質の設計原理は、

$$Z = (VN - VD) / \Delta V$$

を最小にする配列を探すことである。ここでVNは天然状態のエネルギー、VDは変性状態の構造アンサンブルの平均エネルギー、 ΔV は変性状態のエネルギーの標準偏差をそれぞれ表す。つまりZスコアは、[天然状態のエネルギーの偏差値]である。その天然状態のエネルギー偏差値が十分低くなければ生きてない。

今回は、鋳型構造として Albumin binding domain 3 本ヘリックス束構造を選んだ。具体的には、配列設計と分子動力学(MD)計算を繰り返して行う。

(1) ランダム配列から、配列を動変数としてシミュレーテッドアニリング法を行い、Zスコアが最適になる配列を探索する。

(2) その配列を用いてMDを行い、設計の成否を確かめる。

(3) MDの軌道が鋳型構造に到達しない場合はこれを変性構造アンサンブルに加え再び(1)を行う。

W.Jin, S.Takada : Protein design and foldability

3G1400

ランダム分断化ライブラリーからのセクションによる酵素の切断・重複可能な部位の検索

○平賀 香、山岸 明彦、大島 泰郎 (東薬大・生命科学)

蛋白質を構成するユニット構造を実験的に解析することを目的として、遺伝子工学的手法を用いてモデル蛋白質の全領域にわたるランダム分断化ライブラリーを構築し、機能セクションによって切断可能な位置、すなわちユニット境界の検索を行った。

トリプトファン合成酵素 α サブユニットの遺伝子 (*trpA*) 上のランダムな位置に停止コドン・開始コドンを含むリンカーを挿入した分断化ライブラリーを構築し、*trpA*⁻の大腸菌を形質転換し最少培地で培養することにより、活性を保持した変異型酵素を選択した(99年度本年会)。その結果、N末及びC末側の2本のフラグメントからなる2フラグメント酵素や、切断されていないが部分的な重複挿入または欠損が起こった1フラグメント酵素が数多く得られ、TIM バレル構造を持つ同酵素には切断・挿入または欠損可能な場所が複数あることが分かった。

2フラグメント酵素の場合、多くはフラグメント間に重複があったが、エキストラヘリックス2'後(73位)またはヘリックス5後(170位)のループ周辺での分断化酵素が得られ、これらの場所で切断可能であることが分かった。また、1フラグメント酵素で欠損や短い重複が起こる場所も73位と170位付近に集中していた。全ての変異型についてフラグメント重複や部分的な重複挿入の起こりやすい位置をマッピングしたところ、73位と170位に明らかなピークが観測された。これらのことから、73位と170位周辺に単位フラグメントの境界があり、切断が可能なこれらの位置ではフラグメントの重複や挿入も可能であることが明らかになった。また同様の手法を用いた最小相補フラグメントの検索実験から、重複領域のある場合にはこれらのユニット境界点でN末側フラグメントからC末側フラグメントへとTIMバレル形成フラグメントが切り替わることが示唆された。

K.Hiraga, A.Yamagishi and T.Oshima : Searching for cleavage and duplication sites from random fragmented library of an enzyme

3G1345

有利アミノ酸変異の同時蓄積による高速適応歩行

○相田 拓洋¹、芝中 安彦¹、伏見 譲² (¹ノバルティスファーマ(株)研究本部、²埼玉大・工・機能材料)

ランダム変異と淘汰を繰り返す従来の適応歩行法に代わり、プレスクリーニングで得た有利アミノ酸変異の蓄積技術を用いたDNAシャフリング法やMutation scrambling法が利用されつつある。Mutation scrambling法は、野生型DNA断片と各々の有利アミノ酸変異を含んだ変異型DNA断片を適当な混合比で混合し、オーバーラップ伸長により様々なアミノ酸置換の組み合わせを持つ多重変異体の2次ライブラリーを作成する技術である(内山,1999)。我々は、「アミノ酸置換効果はおおむね独立的に寄与する」との仮説に基づいて、変異型断片の存在比を相対的に大きくすることで、高い適応度を有する多重変異体を効率よく作成できる可能性を理論的に示した。2次ライブラリー作成時の野生型断片と変異型断片の混合において、変異型断片のモル分率をrとする。また、適応度地形は、グローバルにスロープが存在する富士山型適応度地形に近い地形と仮定する。結論として、rが大きくなるにつれて多重変異体集団の適応度分布は、適応度の高い方向にシフトし、アミノ酸置換の“最適な組み合わせ”をとる最適変異体の出現確率は大きくなる。しかし、rが1に極めて近づくと逆にその確率が減少する。この減少は、適応度地形に凸凹が存在するためであり、すなわち、アミノ酸残基の非加算効果の表れである。よって、最適変異体を高確率で作成するためのrの最適値r0が存在するはずである。このr0は、地形の凸凹の度合い θ などに依存して決まってくる。このMutation Scrambling法は、多重変異体のスクリーニングサイズが小さな場合において、より効果を発揮する。また、ここで述べた方法は、局所的な適応度地形を計測するために有効な方法でもある。

本研究は、通産省産業科学技術研究開発制度の一環として、新エネルギー産業技術総合開発機構(NEDO)より委託を受けて、実施したものである。

T.Aita, Y.Shibanaka and Y.Husimi : Efficient Adaptive walk using Simultaneous Accumulation of Advantageous Mutations.

3G1415

Y連結ブロックシャフリング(YLBS)法のGFP変異体作成への応用

○北村 幸一郎、木下 保則、西垣 功一 (埼玉大・工)

タンパク質高速進化の方法論として、「ブロックシャフリング」法が有望である。我々はその実現のために、Y連結ブロックシャフリング(YLBS)法を開発した(1999年度生物物理学会発表)。緑色蛍光タンパク質(GFP)をモデル分子としてYLBSを行った昨年までの研究では次のことが分かっていった。(1)8ブロック3段の幾何級数的多様性増殖を通じて、約1600万種の多様性全体はDNAライブラリレベルでは実現したと計算された。(2)全工程を通して特に困難な過程はなく、広く応用し得る技術となっている。(3)DNAシャフル体の多くは欠失突然変異を含み、完成品歩留まりは5%を超えない状態であった。従って(3)が課題として残されていたが、この間の研究により次のことが明らかとなった。即ち、YLBS技術に使用している3種の酵素(制限酵素(*MboI*、*AluI*)、TaqDNAポリメラーゼ、T4RNAリガーゼ)の各々について、不測の副反応の存在が示唆されていたが、(I)TaqDNAポリメラーゼを用いたPCR反応では約 10^{-4} の頻度で点突然変異が導入されるが、欠失変異に関しては基質の配列依存限定的であり、欠失現象のごく一部を説明し得るに停まる事(II)制限酵素のうち*AluI*は切断部位にズレのある可能性が示され、これが欠失の主因であろうと考えられたこと。(III)、T4RNAリガーゼ自体には異常な活性は認められない(上記の標品に混在するエキソヌクレアーゼなどの作用の可能性も幾分残されているが)。

以上のことから、今後の改善の目途がたつたと言える。次にタンパク質ライブラリーとして実現する為に*in vivo* translation系用のベクター/宿主系(pGFP-YLBS.INV α F)を確立した。ライブラリーの完全性(すべての要素が含まれていること)テストの第一段階として今回GFPの部分的4ブロックシャフリング体を作成している。発表ではタンパク質ライブラリーまで進めた結果を報告する予定である。

K.Kitamura,Y.Kinoshita,K.Nishigaki : Application of Y-ligation based block shuffling (YLBS) technology to the construction of shuffled GFP mutants