S3E04

ミオグロビンにおけるモジュールシャッフリング

○若杉 桂輔^{1,2}、平 就介¹、杉 拓磨¹、中野 智美²、石森 浩一郎¹、森島 績¹（¹京大院・工・分子工学、²科技団・さががけ研究 21）

真核生物の遺伝子では蛋白質に翻訳される DNA 塩基配列（エクソン）は、ひとつながりではなく、蛋白質に翻訳されない塩基配列（イントロン）によって分断されている。このことをもとに、エクソンは蛋白質の機能単位に対応しており、イントロンの位置を「のりしろ」とするエクソンの組み換えにより、新規機能をもった蛋白質の進化が促進されたという仮説が提唱された。また、蛋白質の各アミノ酸の距離情報の解析から、蛋白質は連続した 10~40 残基前後のアミノ酸残基からなるコンパクトな構造単位（モジュール）から構成されており、エクソンは蛋白質レベルでモジュールに対応していることが明らかにされた。本研究では、多種多様な蛋白質を生み出してきた自然界の分子進化プロセスであるモジュール・シャッフリング分子進化仮説に着目し、非凡な新規人工機能性蛋白質創製のための画期的な戦略を開発することを目指す。現在、ミオグロビンを題材に選び、新規人工機能性蛋白質の創出系の確立を目指し、Native chemical ligation 法、Yeast display 法、Phage display 法などを用いて、「モジュールのシャッフリング」、さらに「モジュール間相互作用等を微調整させるためのランダム変異の導入」など人工的な分子進化系の構築を試みているので紹介する。また、来るべきポストゲノム時代をにらみ、シグナル伝達を制御可能な新規人工機能性蛋白質をデザイン創製し、新規機能性蛋白質を用いた細胞内シグナル伝達系の人工制御に挑む研究も開始したので合わせて紹介したい。

K. Wakasugi, S. Hira, T. Sugi, T. Nakano, K. Ishimori and I. Morishima : Module Shuffling on Myoglobin

S3E06

非グロビンによるミオグロビン機能の実現：トリプトファン分解酵素から進化したミオグロビン

○鈴木 知彦、横内 浩平（高知大・理・物質科学）

トコブシ、アワビ、サザエをはじめとする軟体動物原始腹足目の口球（糸筋）では、通常のミオグロビン（分子量 16kDa）とは全く別の起源を持つ分子量約 40kDa のミオグロビンが発現している。これらのミオグロビンのアミノ酸配列は、トリプトファン分解酵素の一種である IDO（indoleamine 2,3-dioxygenase）と 26~35 % の一致率を示す。しかし、これらのミオグロビンはトリプトファン分解酵素活性を示さず、酸素平衡能（P50）の測定から明らかにミオグロビンとして機能していることが分かっている。IDO 型ミオグロビンの進化を解明する上で、これらの遺伝子構造知り、IDO のものと比較することは非常に重要である。これまでに、トコブシ及びサザエのミオグロビンの遺伝子構造（エキソン・イントロン配置）が決定された。サザエの遺伝子構造（14-exon/13-intron）をヒトの IDO 遺伝子構造（10-exon/9-intron）と比較すると、9 つのイントロンの位置が完全に一致していた。これらのことは、少なくともヒトと軟体動物が分岐してからのおよそ 5 億 5000 万年の間、これらのイントロンが保存され続けてきたことを意味する。IDO 型ミオグロビンと通常のミオグロビンのアミノ酸置換速度（進化速度）を比較すると、ほぼ同じであった。しかし、単量体として存在するサザエ IDO 型ミオグロビンは、二量体のトコブシ・ミオグロビンよりも明らかに進化速度が速かった。これは、サブユニットの結合に関与するアミノ酸の制約がなくなったためであろうと考えられる。IDO と IDO 型ミオグロビンの構造と機能の関連性を知る上ではその立体構造を知ることが必要である。現在、結晶解析を目指すための一歩として、pQE, pGEX, pMAL を発現ベクターとして用いて、リコンビナントタンパク質の発現を試みている。

T.Suzuki and K.Yokouchi : A myoglobin evolved from indoleamine 2,3-dioxygenase

S3E05

人工設計によるミオグロビン

○磯貝 泰弘¹、太田 元規²、石井 杏奈¹、石田 学^{1,3}、西川 建²（¹理研・生体物理化学、²遺伝研・大量遺伝情報、³姫工大・理・生命）

マッコウクジラのミオグロビン（Mb）と同じ 153 残基からなるポリペプチド鎖は計算上約 10²⁰⁰ 通りのアミノ酸配列を取り得るが、その内どの配列が Mb となり、あるいは、その他のタンパク質になり得るのか？さらに、どのような配列ならば、天然様の「タンパク質」となり、どのような配列が「タンパク質」とならないのか？天然のアミノ酸配列に捕らわれないで考えると、簡単には答えられない素朴な疑問が浮き彫りになってくる。我々は、これらの問題へのアプローチとして、デノボタンパク質設計（人工タンパク質のアミノ酸配列を天然タンパク質とは独立に求める試み）の研究を行っている。安定性の観点から立体構造とアミノ酸配列の適合性を評価する 3D-1D 法を利用して、Mb の立体構造に折り畳まれるように人工的なアミノ酸配列を設計した（Isogai et al., Biochemistry 38, 7431-7443, 1999）。得られた配列は Mb と 25% 程度の配列相同性を示し、合成された人工グロビン（Designed Globin, DG）は、Mb と同様の外形と 2 次構造をもつ球状タンパク質にフォールドした。DG は、1 分子当たり 1 つのヘムを結合し、天然ヘムタンパク質様の可視光吸収スペクトルを示した。DG の 2 次構造は Mb に比べて 5 倍以上の安定性を示したが、NMR や変性実験で検出される側鎖レベルでの構造単一性を欠いていた。疎水性コアのアミノ酸側鎖構造をより制限すべく、DG のいくつかのサイトで Leu → Ile, Val の置換を行ったところ構造特異性（conformational specificity）が改善された（Isogai et al., Biochemistry 39, 5683-5690, 2000）。これらの結果を参照して、タンパク質の構造特異性を評価する分子設計用関数を作製した。ミオグロビンの人工設計を通してタンパク質の構築原理について考える。

Y.Isogai, M.Ota, A.Ishii, M.Ishida and K.Nishikawa : Design and synthesis of artificial globins

S3F01

試験管内遺伝子発現系の構築

○上田 卓也（東大・新領域・先端生命）

生命を理解する上で、生物の使用するシステムの試験管内で再構築は有効なアプローチである。さらに、生命体をもし分子から組み立てることが可能となれば、生命の基本原則を解明する突破口となるであろう。私たちの研究室では、遺伝子発現システムを再構築することを目指し、大腸菌の蛋白質合成系に必須な開始因子、伸長因子、解離因子、アミノアシル tRNA 合成酵素など 31 個の可溶性の因子を、遺伝子操作技術により大量かつ純粋な形で精製した。これらの因子と、T7 RNA ポリメラーゼ、リボソーム、tRNA 画分を用いることで、遺伝子から蛋白質を 1 ml 当たりサブミリグラム単位で生産することが可能であり、この試験管内蛋白質合成系を PURE（Protein synthesis Using Recombinant Elements）システムと名付けた。PURE システムは、単に蛋白質生産の手法として利用できるという応用面のみならず、遺伝子発現システムを分子から再構築した点で意義のあるもとと考えている。さらに、PURE システムは、蛋白質合成系の因子を自由に制御できることから、ribosome-display 法などへの応用が容易であろうと考えられる。本シンポジウムでは、PURE システムの特性を紹介するとともに、人工進化系へ構築や、新機能の蛋白質創製への展開の可能性、さらに PURE システムと他のバイオシステムとの融合による、より高次の試験管内バイオシステムの構築への試みについても議論する。

T. Ueda : Construction of cell-free gene expression system