S3F02

RNA-ポリペプチド複合体の分子進化学

○原田 和雄（東学大・教）

RNA-ポリペプチド相互作用は遺伝子発現制御において重要な役割を果たすとともに、リボソームやスプライソソームのような機能性RNA-タンパク質複合体の順序だった会合をもたらす。このため、RNA-ポリペプチド相互作用の解析は生体機能を理解する上で重要である。しかし、RNA-ポリペプチド相互作用は複雑であり、新しいRNA-ポリペプチド複合体構造が解析される度に、その多様性を思い知らされているのが現状である。我々は、RNA-ポリペプチド複合体の相互作用を解析するための一般的な実験法として、大腸菌を用いたRNA-ポリペプチド相互作用検出系を開発した。この検出系を利用して、HIV RREと強く結合する新規ペプチドをコンピナトリアル・ライブラリーから同定した。さらに、得られたRRE結合ペプチドがRREとより強く結合するよう「進化的」に改変できることも示した。得られた高RRE親和性ペプチドのひとつ(RSG-1.2)は、RREの本来の結合相手であるRevペプチドよりも6~7倍強く結合した。このような新規RNA結合ポリペプチドのライブラリーからの検索は、種々の応用が可能である。たとえば、RREとRSG-1.2との相互作用に関する構造化学的、生化学的解析によりRNA-ポリペプチド相互作用に関する一般的なルールが導けるものと考ええる。また、ライブラリーから選択したRNA結合ペプチドを生体解析のためのツールとして利用したり、抗ウイルス剤として医学的に応用できることが期待される。さらに、新しい機能性RNA-ポリペプチド複合体を人工的に構築するためのビルディングブロックとして利用できるかもしれない。一方、本実験法を用いて、逆にペプチド結合性RNAを検索することも原理的に可能である。

K. Harada : Molecular evolution of RNA-polypeptide complexes

S3F04

ランダム配列からの機能性蛋白質の創出

○四方 哲也^{1,2}（¹阪大応用生物工学科、²科技园、さががけ）

生物に存在する酵素などのタンパク質は一定の構造と高い機能を示す。このような性質をもったアミノ酸配列はどのように進化してきたのだろうか。この研究では、コンピュータ上や試験管内で進化実験を行い、タンパク質進化のルールを発見することを目的とした。まず、コンピュータの中に初期ポリペプチドとしてランダム配列を用意した。次に、1) 初期配列にアミノ酸置換をいれて変異型配列を用意する。2) 経験ポテンシャルを使って、2つの配列をそれぞれ10回ずつ折りたたむ。3) 末端に決めた基質結合部位のアミノ酸が特定の配向になっている頻度を計算する。4) その頻度が高い配列を次の世代の初期配列として1)に戻す。この1)~4)のプロセスを1世代として何度もくり返した。200世代までの進化で、選択をかけた基質結合部位だけでなく、他の部分もほぼ同じ形に収束していくことがわかった。以上のことより、基質結合能だけの簡単な選択でタンパク質全体の高次構造が出来上がることが示唆された。上記の理論的研究に基づき、ランダム配列を持ったポリペプチド(140アミノ酸)を調製し、エステラーゼ反応の遷移状態アナログ4-carboxybutyl-phosphonate (CAII)に対する結合能による選択を行った。各世代では10種類の配列だけを選択にかけた。その結果、3世代でもかなりの結合能の増加が観測された。また、各世代のランダムタンパク質を精製し、エステラーゼ活性を測定した。すると、この人工進化過程で、遷移状態アナログに対して結合能が上がるにしたがって、酵素活性も上昇することがわかった。天然タンパク質に比べれば、得られた人工タンパク質の活性は微小である。しかし、これらの結果は膨大な数の配列を探索することなしに、タンパク質の機能進化が起こりうることを示している。

T.Yomo : protein evolution from random polypeptides

S3F03

自然に学ぶゲノム多様性の創出

○板谷 光泰（三菱化学生命研）

微生物から高等動植物の全塩基配列情報が蓄積している。これらの情報をもとにした静的なゲノム解析によって、大規模な水平伝播（すいへいでんぱ）が確認された。自然では頻繁に生じている水平伝播によると、全然関連のないバクテリアから遺伝子群がある日突然入ってきて、遺伝子のネットワークそのものが突然入れ替わることもあり得る。一世代でゲノムの遺伝子構成が変わってしまうような現象は、「ゲノム変異」という概念がふさわしいのではないかと考えている。自然が延々と為してきたゲノム変異は、実はゲノムの再構築、遺伝子資源の再構築策を我々に教えてくれているのかもしれない。この点を実践的に確かめる動的なゲノム改変、そして成果を応用につなげるゲノム活用への移行は、バイオ研究の必然の流れだと思っている。我々は、ゲノムの全塩基配列という現代のパンドラの箱が開く以前から、枯草菌という柔軟なゲノムを用いたゲノム改変、ゲノム活用戦略を展開してきた。既存の遺伝子工学ではプラスミドベクターを用いて、数kbから十数kbのDNAを自由に操作できる。これに対して、枯草菌ゲノムベクターを用いれば、自由に操作できるDNAのサイズが1~2桁アップする。遺伝子をセットで操作することが可能になりつつある例として、枯草菌と納豆菌のゲノムをモザイク化させ、枯草菌に納豆をつくらせたり、900kbを越す巨大DNAを枯草菌ゲノムに水平伝播させた例を紹介したい。さらにいくつかのゲノム再編成の手法を組み合わせると、多様なゲノム変異を創生する「ゲノム進化、ゲノムデザイン」という新しい方法論を確立できそうである。

M. Itaya : Creation of bacterial genome diversity innovated by horizontal transfer

S3F05

ブロックシャッフリングによる新規タンパク質の創製

○辻 融¹、柳川 弘志^{1,2}（¹三菱化学生命研、²慶大院・理工）

進化分子工学（点突然変異の導入と機能の向上を指標とした選択）により、天然のタンパク質は速やかに進化することが示されている。この事実は、fitness landscapeの頂上付近の地形がコヒーレントなものであることを意味している。一方で、fitness landscapeの麓付近の地形の特徴は、タンパク質の起原および進化の初期の段階を考察する上で非常に重要であるが、ほとんど知られていない。我々は、モジュールや二次構造を単位として入れ換えたバルナーゼ変異体のfoldabilityや活性を調べ、いくつかの変異体が部分的にfoldした構造をもつこと、CDスペクトルでは明確な二次構造を確認できない変異体が酵素活性をもち、阻害剤であるGMPとの結合により構造形成が誘導されるなどの現象を観測した[1]。我々はこのような性質をもつタンパク質をfitness landscapeの麓付近に存在する進化的中間状態にあるタンパク質と考えている。様々なブロック（エクソン、モジュール、二次構造、機能モチーフ等）を組み合わせて構築したコンピナトリアルライブラリーには、多数の進化的中間状態にあるタンパク質が存在するかもしれない。このライブラリーを進化分子工学の手法に適用すれば、fitness landscapeの麓付近の地形の特徴を記述できる可能性がある。このようなコンセプトのもと、我々は相同配列を含まない任意の複数のペプチド鎖をコードするDNA断片をランダムに連結できるRandom Multi-recombinant PCR (RM-PCR)法を開発した。本講演では、RM-PCR法の詳細とこの手法により構築したコンピナトリアルライブラリーの進化実験系への適用について議論したい。[1] 辻融、柳川弘志、科学、69、928（1999）。

T.Tsuiji and H.Yanagawa : Creation of novel proteins by block shuffling