1M1630

YLBS 法による 8/16/32 アミノ酸重合度階層の高品位ペプチドライブラリーの創製

○植崎 真介¹、木下 保則¹、小林 輝章²、西垣 功一¹ (¹埼玉大・工、²ジェンコム (株))

タンパク質を高速進化させる方法論として我々は組換えタンパク質進化法を検討している。このために Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法などを開発してきた。本研究では、この技術を利用してそれぞれ生理的意味の異なる「8/16/32 アミノ酸重合度階層」のペプチドライブラリーを創製することを目指した。20 種類および選択 7 種のアミノ酸に対応するトリヌクレオチド (コドン) を出発材料としてそれぞれ 8、16、32 ブロック連結 DNA ライブラリーを構築した。この間に、これまで問題となってきた「欠失現象」については、使用している制限酵素の特性を踏まえた方式を採用し、コンストラクトを改変することにより問題を解消した。また、ブロックの出現頻度の偏りに関しても出発ブロックの初期投入量を変化させることやブロック配列を吟味することで基本的に回避できることを確認した。7 種類要素 16 ブロック連結ライブラリー (多様性 $7^{16}=3.3 \times 10^{13}$)、および 20 種類要素 8 ブロック連結ライブラリー (多様性 $20^8=2.56 \times 10^{10}$) においては 100pmol スケールの実験系において原理的に全多様性を実現可能であり、この実現を目指している。本発表では創製したライブラリーにおけるクオリティーの問題 (多様性完全性問題など) について報告する予定である。

S.Narazaki,Y.Kinoshita,T.Kobayashi,K.Nishigaki : Creation of high quality peptide-library by YLBS technology: pools of 8/16/32 degrees of polymerization

1M1700

ファージディスプレイ法を用いた新規蛋白質の構造安定化における新手法の確立

○杉 拓磨、伊原 正喜、石森 浩一郎、森島 績 (京大院・工)

多くの蛋白質は、その機能を司る機能部位と、水素結合などの残基間の相互作用による構造の安定化部位から構成されている。我々は過去に、シトクロム b_5 (Cyt b_5) を例として、構造安定化部位 (Core2) を保存し、ヘム結合能を有する機能部位 (Core1) のみを組み換えることによって新たなヘム結合蛋白質が創製できると考え、そのヘム結合部位をヘモグロビン α 鎖のヘム結合部位で置換した変異体 $b_5\alpha$ b_5 を作製した。しかし $b_5\alpha$ b_5 はヘム結合能を有するものの、Core の境界付近での残基間の相互作用が損なわれ、その蛋白質構造は不安定化した。そこで本研究では、この Core 境界付近の相互作用を再生することで構造を安定化できると考え、 $b_5\alpha$ b_5 の構造安定化を通してこの手法の確立を試みた。従来の我々の研究から Core 境界において、相互作用を失っていると示唆された 29、30、74、75、76 番目の残基にランダム変異を導入し、 1.8×10^6 個の変異体を M13 バクテリオファージに提示させた。次にヘムへの親和性を指標として構造の安定な変異体を選択するため、変異体集団をヘム固定化カラムに加え、親和性の低い変異体を洗い流すサイクルを 5 回繰り返し、サイクルごとに変異体集団の一次配列を確認した。その結果、5 サイクル目では Phe29、Cys30、Thr74、His75、Tyr76 の変異が高頻度で見られた。この変異を全て含む変異体 X と $b_5\alpha$ b_5 について MD 計算を行い、その構造を比較した結果、ヘム結合部位の主鎖の RMSD が 3.63 Å 異なり、変異体 X の主鎖の方がヘムに近づいていることが明らかとなった。このことは、ヘムとヘム結合部位が相互作用しやすくなるように、Core の境界付近に存在する残基間の相互作用が再生され、その結果、全体の構造が安定化したことを示している。発表では得られた変異体の分光学的特性や今回の手法の有用性についても議論する。

T. Sugi, M. Ihara, K. Ishimori, I. Morishima : A Strategy for the Stabilization of Artificial-Protein Structures by Phage Display

1M1645

コドン出現頻度が制御可能なランダム DNA ライブラリーの設計と構築

○空本 清香、田渕 一郎、上野 真吾、伏見 譲 (埼玉大・工)

タンパク質の進化分子工学における配列空間のグローバルな探索には、長い ORF を持つランダム DNA ライブラリーの構築を必要とする。ランダムペプチドライブラリーを作るための従来法: NNK、NNS(N=A/T/G/C, K=G/T, S=A/C) のコドンからなるランダム DNA ライブラリーは、ORF 中のストップコドンの出現、アミノ酸出現確率に特定のバイアスがかかる点で、長鎖ライブラリーの品質に問題があった。我々は、ORF 中のストップコドンの排除、個々のアミノ酸出現確率の制御を可能とする MLSDS(Multi-Line Split DNA Synthesis) 法を開発した。MLSDS 法は DNA 合成機を複数台使用し、3 塩基伸長するごとに、混合、分割を繰返すコンビナトリアル化学手法で、種々のバイアスのかかったアミノ酸組成が重畳したものが合成できる。このとき各 ATGC 混合比を多様に設定することによりアミノ酸出現確率が制御できる。

実験目的によりライブラリーの最適なアミノ酸組成は変化する。遺伝的アルゴリズムを用いて ATGC 混合比最適化プログラムを開発した結果、要求に応じた簡便かつ精密なアミノ酸出現確率制御が可能となった。DNA 合成機の台数も 3 ないし 4 台で十分であることがわかった。アミノ酸 20 種の平均化を行う場合、理想配列 (アミノ酸 20 種 5%、ストップコドン 0%) との相関係数が従来の NNK では 0.16 であったが、合成機 3 台で最適化したところ 0.91 と向上した。また、3 台の合成機を用いて DNA ライブラリー (ランダム部位 51mer) を実際に合成したところ、アミノ酸出現頻度の実測値と設計値との相関係数が 0.83 となり、ほぼ設計どおり合成されていることを確認した。2~8 倍長 (ランダム部位 106~414mer) のライブラリーの作成にも成功した。以上のことから、MLSDS 法は長い ORF を持つランダム DNA ライブラリーを構築する手段として有用であることが示された。

S.Soramoto,I.Tabuchi,S.Ueno,Y.Husimi : A random DNA library with any controlled codon usage

1M1715

放射光 X 線小角散乱法を用いた融合蛋白質のドメイン間距離とコンフォメーションの評価

○新井 亮一^{1,2}、Yao Cong³、Willy Wriggers³、西川 幸宏²、長棟 輝行¹、藤澤 哲郎² (¹東大院・工学系・化学生命工学、² 理研・播磨・構造生物化学、³Scripps Res. Inst., Mol. Biol./Comp. Struct. Biol.)

2 つの異なった機能を持つ蛋白質ドメインを結合して作製する融合蛋白質は、免疫測定への応用など、様々な応用分野がある。2 つの蛋白質ドメインのそれぞれの機能を同時に保持させるためには、ドメイン間のリンカーを適切に設計することが重要である。我々は、以前、蛋白質ドメイン間のリンカーとして、 α ヘリックスを形成するペプチドである (EAAAK)_n ($n=3\sim5$) を設計し、その長さを変化させて 2 つのドメインを分離する効果を検討した。モデル系として、緑色蛍光蛋白質 (GFP) の変異体である EBFP と EGFP のキメラ蛋白質を用い、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) などを用いて検討したところ、 α ヘリックスリンカーの長さに応じて、両ドメインを分離する効果が高まることが示唆された。そこで、今回、EBFP、EGFP 両ドメイン間のコンホメーションや距離を明らかにするために、SPRING-8、BL45XU にて小角 X 線散乱実験を用いた解析を行った。その結果、小角 X 線散乱実験によって得られた回転半径 (Rg) や最大動径 (Dmax) などのパラメーターは、ヘリックスリンカーを長くするほど大きくなった。さらに、小角散乱実験から得られたデータをもとに電子密度 envelope を計算し、リンカー部分を Ab initio 計算により構築しフィッティングしたところ、EBFP と EGFP の間に α ヘリックスリンカーが斜め方向に配向し、2 つのドメインが分離したダンベル型の構造をとっていることが明らかになった。また、リンカーを長くするに従い、両ドメイン間距離が長くなることもモデルで示され、このヘリックスリンカーは、両ドメイン間の距離を制御することができるリンカーであることが示された。本研究の結果は、今後、人工的な融合蛋白質設計において役立つことが期待される。

R.Arai, Y.Cong, W.Wriggers, Y.Nishikawa, T.Nagamune, T.Fujisawa : Evaluation of conformation and inter-domain distance of fusion protein by using synchrotron small-angle X-ray scattering technique