B217

天然配列と非天然配列のリミックスから創製した人工タンパク質：その性質解析

○柏木 健司^{1,2}、芝 清隆^{1,2} (¹癌研・蛋白創製、²CREST JST)

天然のコイルドコイル配列を繰り返して作成した人工タンパク質 # 3 2 0 は、安定な α ヘリックス構造を取ることや、変性状態よりも小さい回転半径を取るなどの性質から、ある程度の折り畳み構造を持つと思われる (Protein Engn. 16:57, 2003)。この # 3 2 0 はセリン tRNA 合成酵素のコイルドコイル構造部分の 1 4 残基長の配列を約 5 回半繰り返し、その後ろにフレームシフトによる非天然の配列 1 5 残基が続いた配列を持つ。本発表では # 3 2 0 の持つ各種の性質がコイルドコイル配列の繰り返しのどの程度依存しているのかを検討するため、# 3 2 0 遺伝子内の異なる位置でフレームシフト変異を導入し天然配列と非天然配列がいろいろな割合で出現する変異体タンパク質を 4 種類作成し、その物理化学的な性質を解析した。まず、CD スペクトルを測定し 3 つの変異体が α ヘリックスを形成していること、その pH や熱、塩酸グアニジンに対する安定性はフレームシフト変異の位置が数残基ずれるだけで、大きく異なることが示された。また、折りたたみの協同性が親配列よりも若干上昇した変異体や、親配列とは別の折りたたみの経路を取ると考えられる変異体が存在していた。次に、流体半径をゲル過クロマトグラフィー、および動的光散乱で測定したところ、殆どの変異体が凝集の傾向を示したが、1 つの変異体が単分散の多量体構造を形成していた。このように、フレームシフト変異が導入される位置が数残基程度ずれるだけで様々な性質を示す変異体が得られることから、コイルドコイル配列の長さ以外にもタンパク質の 2 次構造形成や安定性に寄与する条件が存在すること、および単純な繰返し配列にわずかなフレームシフト変異を導入することによる人工タンパク質の試験管内進化の可能性が示唆された。

K.Kashiwagi and K.Shiba : Synthesis of artificial proteins from remixing of native and non-native sequence motifs.

B219

進化蛋白質工学のための高品質ランダム DNA ライブラリーの作製

○上野 真吾¹、田淵 一郎^{2,3}、空本 清香¹、深石 圭¹、新井 秀直¹、伏見 譲¹ (¹埼玉大・工、²株式会社 Tokyo Evolution Research Center、³埼玉バイオグループ・埼玉県中小企業振興公社)

蛋白質の進化分子工学において、求める蛋白質ごとに最適な初期ペプチドライブラリーを用意することは、進化実験を効率的に行う上で重要である。我々は、各アミノ酸出現頻度の一様化やストップコドンの排除、二次構造の形成に関わるアミノ酸の含有率等を操作できる MLSDS (Multi-Line Split DNA Synthesis) 法を開発している。MLSDS 法は DNA 合成機を複数台使用し、3 塩基 (1 コドン) 伸長することに混合・分配を繰り返すコンビナトリアルケミストリー手法を用いて合成される。その際、各アミダイトの ATGC 混合比を多様に設定することによりアミノ酸 (コドン) 出現頻度を制御できる。

20 種アミノ酸出現頻度の一様化を行ったもの、天然に存在する球状蛋白質の平均アミノ酸組成と同じ組成を持つもの、および、Cys の出現率をゼロとし、それ以外のアミノ酸を一様組成にしたものの、3 種のランダムライブラリーを、遺伝的アルゴリズムを用いた ATGC 混合比最適化プログラムによって設計した。なお、これら 3 種はストップコドンも排除されている。今回は、それらライブラリーを実際に合成し、評価した。その結果、アミノ酸出現頻度の実測値と設計値の相関係数が各々 0.9 前後となり、設計どおり合成できたことを確認した。今回は、それらの結果を中心に報告する予定である。

S.Ueno, I.Tabuchi, S.Soramoto, K.Hukaisi, H.Arai, Y.Husimi : High quality Random DNA Libraries for evolutionary protein engineering

B218

人工ランダムポリペプチドの溶解性に対する実験進化

○伊藤 洋一郎¹、五十嵐 育子¹、川馬 利宏¹、卜部 格¹、四方 哲也^{1,2,3,4,5} (¹阪大院・応用生物、²阪大院・情報科学、³阪大院・生命機能、⁴東大院・総合文化、⁵科技団・さきがけ)

高分子物性の立場から考えると、天然球状蛋白質は比較的電荷が低い、疎水性度は高いにもかかわらず、非常に高い溶解性を示す特殊なポリペプチドである。それは特殊なアミノ酸配列に起因している。我々はポリペプチドの溶解性に対する知見を得ることを目的として、無作為なアミノ酸配列を持つ人工ランダムポリペプチドの溶解性を指標とした進化実験を行った。

先行研究として、無作為に選んだ不溶性を示す人工ポリペプチド (RP3-34H) から、ランダム変異と溶解性を指標とした選択 (GFP-based selection) を繰り返し、可溶性が現れる進化過程が再構築できたことを報告した (第 39 回年会)。今回は、より多くのクローンからの選択を可能にするため、蛍光セルソーターを用いた選択実験系を開発し、人工ポリペプチド RP3-42H より溶解性に対する進化実験を行った。結果：RP3-42H は RP3-34H と比較して、34% のホモロジーを持ち、疎水性度が約 1.1 倍低く、溶解性は約 40% であった。RP3-42H を出発配列として、進化サイクルを 2 回繰り返した。その結果、得られたトップクローンの蛍光強度は世代を重ねるごとに増加していた。またその溶解性は GFP 融合蛋白質そして人工ポリペプチド単独発現条件共に増加がみられ、1 世代目のトップクローンでさえ完全に可溶性を示した。アミノ酸配列は RP3-42H と比較して 1 世代目、2 世代目のトップクローンはそれぞれ、9 個、21 個のアミノ酸置換が確認され、その疎水性度は世代に対して減少が見られた。これらの傾向は先行研究と同様であった。さらによりグローバルな配列空間を考えるため、25 種類の異なった配列を持つ人工ポリペプチドの溶解度及び疎水性度を解析した。本発表では、溶解度—疎水性度の蛋白質配列空間を用いて先行研究を含めたこれらの結果を議論する。

Y.Ito, I.Igarashi, T.Kawama, I.Urabe and T.Yomo : Evolution of an arbitrary sequence in solubility

B220

タンパク質の構造特性に基づく分子選択系の開発

○松浦 友亮^{1,2}、Pluckthun Andreas³ (¹阪大院・情報科学科、²J S T ・ P R E S T O 研究員、³Universitat Zurich, Switzerland)

蛋白質は機能を有するだけでなく、可溶であり、かつ特定の構造に折り畳まれることによりプロテアーゼなどによる分解を避けることができる。このような、可溶性、構造、機能の 3 つの要素を同時に持ちうる性質は、進化の過程において、これら全ての要素を持つように選択圧が働いたためだと考えられる。

リボソームディスプレイ法は、次のようにステップ (1) ~ (4) を繰り返すことにより、特定のリガンドに結合する蛋白質分子を取得する手法である。(1) ライブラリーをコードする mRNA から、in-vitro 翻訳系により、リボソーム、mRNA、翻訳された蛋白質の複合体を作り出す。これは終止コドンを mRNA から省くことで可能となる。(2) 提示された蛋白質のうちリガンドに対する親和性があるものは結合する。結合しないものを取り除く。(3) 結合した蛋白質をコードする mRNA を抽出し、RT-PCR により増幅する。(4) 最初のステップに戻り (1) ~ (3) を繰り返す。我々は、天然蛋白質の進化の過程を模倣するために、リボソームディスプレイ法により (A) 可溶である (B) プロテアーゼ耐性である蛋白質を選択する方法を開発した。

この結果リボソームディスプレイ法により、タンパク質の機能、可溶性、プロテアーゼ耐性、3 つの選択圧をそれぞれ単独で適用でき、さらには組み合わせでも用いることができ。つまり、選択圧を自在に操作することが可能となった。また、リボソームディスプレイ法の最大の利点である扱える多様性の大きさ、また、多様化のステップが容易に導入できる点を考えると、限られた時間内に目的の機能性蛋白質を取得できると考える。

ref:FEBS Lett 539, 24-8 (2003).

Matsuura, T. and Pluckthun, A. : Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display