B221

In vitro DNA virus を用いた RNase S 蛋白結合ペプチドの進化

○田渕 一郎^{1,2} (¹ 株式会社 Tokyo Evolution Reseach Center、² 埼玉バイオグループ、埼玉県中小企業振興公社)

In vitro virus (mRNA display) はその探査できる分子数の多さ、系の自由度の高さにより多くの成果を挙げている。我々はそれをさらに改良した in vitro 進化系を開発してきた。クルードなターゲットに対する系の適用を可能にする in vitro DNA virus、合理的スタートライブラリ作成法である MLSDS(Multi Line Split DNA synthesis) 法、迅速高効率なゲノム作製法である Y-ライゲーション法などである。本研究ではこれらの技術を用い、RNase S 蛋白に結合するペプチドの高速進化実験を行った。合理的な 4 種塩基配合比を設計した MLSDS 法により、19 種のアミノ酸から成る 10 a.a. 長ペプチドライブラリを作成し in vitro DNA virus に提示した。有利変異体の点変異の蓄積による機能の向上理論及び構造予測から推定される最適アミノ酸のデータに基づいての各位置のアミノ酸出現率を合理的に設計し、その出現率が実現するように codon 単位で塩基配合比を設計した。ただし、生物工学用タグとして利用する際に好ましくない Cys を含まないものになっている。翻訳系 codon usage に対する最適化も行った。この in vitro DNA virus の進化サイクルを実際にまわし、ターゲットに対して強く結合するペプチドを得た。得られたペプチド集団にはコンセンサ配列が存在した。得られたペプチドは固定化 RNaseS アフィニティクロマグラフィ、ウエスタンブロッティングなどに用いるタグとして有用である。

本研究は、従来法の mRNA display, Ribosome display では実行不可能な RNase などのクルードなターゲットにも in vitro 進化系が適用できる事を示している。

Ichiro TABUCHI : Evolution of RNaseS binding peptides using in vitro DNA virus

B223

進化分子工学的手法によるフェニルアセトアルデヒド還元酵素の改良

○牧野 祥嗣、大利 徹、伊藤 伸哉（富山県立大工・生工研セ）

フェニルアセトアルデヒド還元酵素 (PAR) は、ケトン類から光学活性アルコールへの還元反応を、幅広い基質について高い立体特異性をもって行う酵素である。本酵素の補酵素 NADH は、2-propanol を水素供与体として本酵素自身によって再生可能であるが、高濃度の 2-propanol 存在下では本酵素の活性は低下する。そこで本研究では、高濃度の 2-propanol 存在下でも活性の低下のない PAR への、進化分子工学的手法による改変を試みた。

まず、PAR 遺伝子の全長にランダムに変異を導入したライブラリを調製した。次に、各々のクローンを培養した大腸菌を用いて、2-propanol の存在下基質と反応させた後、HPLC により分析した。その結果、1 世代目で最も高活性であったクローンでは、野生型と比較して 2 箇所のアミノ酸配列の置換が認められ、菌体あたりの酵素の発現量が増加していた。このクローンの 2-propanol への耐性をみたところ、野生型とあまり変わらなかったことから、活性上昇の効果は発現量の増加によるものと考えられた。ところが、このクローンに更に変異を導入し選択した 2 世代目では、基質の変換活性は高いが有機溶媒耐性が低く、発現量の少ないクローンなどが現れた。この後更に世代を重ねた結果得られたクローンとあわせて、変異体酵素の解析を行ったので報告する。

Y.Makino, T.Dairi and N.Itoh : Directed evolution of phenylacetaldehyde reductase

B222

ファージの感染能を指標としたランダム配列ポリペプチドの人工進化3

○林 勇樹²、坂田 啓司⁷、牧野 祥嗣⁶、卜部 格¹、四方 哲也^{1,2,3,4,5} (¹ 阪大院・応用生物工、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・さがけ研究 21、⁶ 富山県立大・生工研セ、⁷ 科技団・研究プラザ北海道)

天然蛋白質は、単一の構造を形成し、特異性の高い機能を発揮する。この構造と機能は自然の進化プロセスを通して生き残り獲得されたと考えられる。それでは、ランダムなアミノ酸配列を持つポリペプチドから進化的に機能を持つポリペプチドを創り出すことが可能だろうか。そこで本研究では変異と選択からなる進化プロセスを用いて、1 つのランダム配列ポリペプチドから高い機能を持つポリペプチドを創り出すことを目的とした。具体的には、バクテリオファージ fd-tet を用い、感染能を指標とした系を構築した。ファージ上の細胞感染に関与する蛋白質ドメインをランダム配列ポリペプチドに置換したファージ (fd-RP) を作成し、置換部位に変異を導入し、10¹ 程度のファージライブラリを作成した。その中から大腸菌に対して最も高い感染能を示すファージを選択し、変異を導入する過程を繰り返した (第 39 回年会)。変異と選択を 7 回繰り返して得られた変異体ファージ fd-7 の感染能は fd-RP に比べ 240 倍増加した。また発現したファージの粒子数と提示しているランダム配列ポリペプチドの数を解析した結果、fd-RP に比べ fd-7 では共に増加した (第 40 回年会) (1)。次に選択に用いる変異体ファージライブラリを 10³ 程度に拡大した選択系を構築した。10³ 程度の変異体ファージライブラリを大腸菌に競争的に感染させた。感染した大腸菌からファージを増幅し、同様に感染させる過程を繰り返すことで、より高い感染能を示す変異体ファージライブラリの選択を行った。変異と数回の選択を繰り返した結果、ファージライブラリの感染能は次第に増加した。発表では、前年会上に引き続き、選択系の進行状況を報告する。(1) Hayashi. Y., Sakata. H., Makino. Y., Urabe. I., Yomo. T., *J.Mol.Evol.*, 56(2): 162-168 (2003)

Y.Hayashi,H.Sakata,Y.Makino,I.Urabe and T.Yomo, : Evolution of polypeptide with random sequence based on fd-phage infectivity

B224

ランダム配列ポリペプチドは DNA 結合タンパク質になりつつあるか

○豊田 一志¹、中島 敏博^{1,2}、卜部 格¹、四方 哲也^{1,3,4,5,6} (¹ 阪大院・応用生物工、² 化血研、³ 阪大院・情報科学、⁴ 阪大院・生命機能、⁵ 東大院・総合文化、⁶ 科技団・さがけ 21)

ランダムな配列の人工ポリペプチド(ランダム配列ポリペプチド)を用いた構成的な手法によって、タンパク質一般のもつ普遍的な原理の抽出を試みている。

まず、特定の構造をもたず、大きな自由度をもった状態のランダム配列ポリペプチドを初期配列とする。その配列から、少しずつアミノ酸を置換しながら、少数の自由度のみ(たとえば DNA 結合能)が固定されるような条件下で、よりその自由度が固定されるようなもの(より DNA に結合するもの)を選択していく。その過程で、ポリペプチド全体の自由度も次第に減ってゆき、タンパク質様の構造をもつようになっていくことが期待される [1]。

前回までに、ファージディスプレイ法と BIAcore(表面プラズモン共鳴センサ)を用いて、DNA 結合能による選択系を構築したことを報告した(本会 2002 年度年会)。配列に加える変異率、ライブラリーの大きさや、温度、pH、塩濃度、選択圧などの条件をできるかぎり一定に保ちながら、さらに変異と選択のサイクルを重ねていったところ、回収されるファージ数と S/N 比(溶出時と洗浄時の回収ファージ数比のようなもの)が指数関数的に増加した。各世代ごとに、選択されてきたクローンをランダムにサンプリングし、その配列を決定して、分子系統樹を描いた。系統樹によるグループ分けをもとに、進んだ世代のファージクローンをいくつか選んで解析した結果、DNA に特異的に結合解離することが確認された。発表では、ポリペプチドを単独で発現させて物性測定した結果も含めて、系統樹上に配列空間を描いて解析した結果について議論したい。

[1] Yomo T., Saito S. and Sasai M., *Nat. Struct. biol.* **6** (1999)

H.Toyota, T.Nakashima, I.Urabe and T.Yomo : Can a random polypeptide evolve to be a DNA binding protein?