進化分子工学に基づいた人工蛋白の 創出と創薬への展開

特集 プロテオーム創薬とDDS

芝 清 隆*

Biopharmaceuticals based on in vitro protein evolution

In this review, I overview “evolutionary molecular engineering” in these 10 years, and discuss how it will change in the age of “Genome and Proteome”.

“Evolutionary molecular engineering” or “*in vitro* evolution” has emerged at beginning in the 1990's as a basic science asking origin of genes. From the stream, powerful new technologies, such as aptamer selection, peptide-phage selection, shuffling PCR etc. have been invented and, with these technologies, we are now able (i) to evolve existing proteins to desired direction *in vitro*, and (ii) to create functional peptides *de novo*.

The stream, of course, affected and continues to affect the area of biopharmaceutical. The first artificial biopharmaceutical was a genetically modified insulin that has been approved in 1996. Since then, several artificial proteinous drugs have been approved including Enbrel, Ongak and Infergen. Most of these artificial proteins have been rationally engineered but not evolved *in vitro*. However, many novel “evolved” are under clinical trials and they should be approved in the near future.

I have developed a novel type of protein evolution system, **MolCraft**. With **MolCraft**, we can synthesize novel proteins by remixing existing peptide motifs. I will introduce of potentials of **MolCraft** in biopharmaceuticals and bionanotechnology.

この総説では進化分子工学のこの10年の軌跡と、ゲノム時代に入った21世紀での新たな展開を紹介する。

進化分子工学、あるいは試験管内進化系は、1990年代初頭に遺伝子の誕生の研究を目的として勃興した。進化分子工学研究からはいくつかの強力な実験手法が生み出された。

進化分子工学研究はもちろん、創薬にも大きな影響を与えてきた。近い将来、進化分子工学的に改変された蛋白質製剤が承認されるであろう。

最後に、筆者らの新しいタイプの蛋白質進化システム、**MolCraft**を紹介し、その創薬、バイオナノテクノロジーに与える影響を論じる。

Kiyotaka Shiba*

key words : protein engineering, evolutionary molecular engineering, *in vitro* evolution, biopharmaceutical, nanobiotechnology

本稿では、90年代初頭にはじまった進化分子工学研究が、この10年にどのような進展を遂げてきたのか、さらに今世紀に入り、ゲノム生物学の円熟と相まってどのような展開をはじめているのかについて解説し、創薬、DDS、ナノメディシンに与える影響も紹介してみたい。

進化分子工学で創られる人工蛋白質

“進化分子工学”（分子進化学、進化学、試験管内進化系、加速型分子進化などともよばれる）とは、その名の通り、核酸およびその翻訳産物であるペプチド・蛋白質を実験室のなかで人工的に進化させ、新しい機能を持った分子や、機能の特化した分子を創り出そうとする研究である¹⁻³⁾。

進化分子工学実験では、まず変異体集団（ライブラリー）が調製され、その集団のなかから実験者が狙っ

* Department of Protein Engineering, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, and CREST/JST 財団法人癌研究会 癌研究所 蛋白質創製研究部, CREST/科技団

た方向に活性が特化したクローンを選択する作業が進められる。DNA, RNA, 蛋白質(ペプチド)をそれぞれ対象とした進化分子工学実験が存在するが、基本的にはDNAレベルで調製された変異体集団を、DNAそのものを機能体として直接選択するか(DNA アプタマー, deoxyribozyme),あるいは転写物(RNA アプタマー, ribozyme)や翻訳物(ペプチド, 蛋白質)のなかから選択するのかの違いである。

本稿では、蛋白質(ペプチド)を対象とした進化分子工学に絞って解説する。

進化分子工学実験でのライブラリーの調製を考える場合、つぎの二つのケースが考えられる。① 特定の親遺伝子を設定し、この親遺伝子由来の変異を持った子孫ライブラリーを調製する。② 特定の構造や機能とはあらかじめ関連しない、ランダム配列から構成されるナイーブなライブラリーからスタートする。①の特定の親遺伝子から出発する実験は、無方向な変異を持つ子孫集団のなかで、より環境に適した変異を持つものが繁殖に有利となる、といったネオ・ダーウィニズム的進化を模したような実験である。これに対して、②のナイーブなライブラリーから出発する実験は、一番最初の原始遺伝子の誕生を模したような戦略なのかもしれない⁴⁾。

特定遺伝子から出発する進化分子工学と、ナイーブなライブラリーから出発する進化分子工学が、それぞれ実際の現場でどのように使い分けされているかについて紹介してみよう。たとえば、すでに利用されている工業酵素の性能を向上させるために、その酵素の耐熱性をよくさせる必要があるとしよう。この場合、まず野生型の親遺伝子全体にランダムに塩基置換変異を導入し、無方向に変異の導入された子孫遺伝子ライブラリーを作製する。このライブラリー中には、耐熱性が向上したもの、逆にわるくなったもの、あるいは野生型と同じものが含まれている。ライブラリー中のどれくらいのクローンを調べれば、目的とする耐熱性が向上したクローンに遭遇するかは実験によって異なるが、このような耐熱性の向上実験では、 10^9 弱のサイズの探索で耐熱性の向上した変異体が得られるようである⁵⁾。ハイスループット条件で一つひとつのクローンの性格解析を進めるのも一つの方法であるが、条件が許せば、目的

とする変異を持った遺伝子を持つ細胞だけが生育できるような工夫をしかけた *in vivo* での選択⁶⁾も可能である。

それでは、ランダムな配列から構成されるナイーブライブラリーから、上記のような特定の活性を持った酵素で、耐熱性の向上したものがいきなり選択可能であろうか? 答えはノーである。これは、実験室のなかで扱えるライブラリーの多様性のサイズを考えてみると、なぜこれが難しいかがわかる。いまのところ、進化分子工学実験で扱える多様性のサイズは $10^9 \sim 10^{13}$ 程度であり、将来なんらかの技術革新が起こったとしても、このサイズが1桁か2桁向上する程度であると考えてよい。

一方、たとえば100残基からなる蛋白質の可能な配列の総数は $20^{100} = 10^{130}$ にも上るわけだから、可能な配列の(配列空間)のなかで、実際にサンプリングできる割合はほとんどゼロに近いものである。もちろん、ある活性を持つことができる配列が非常に多くある場合には、このような微小なサンプリング効率でも目的とする活性を持つクローンに遭遇することができるであろう。事実、リボザイムの進化分子工学では、ナイーブなライブラリーから出発しながら、アミノアシル tRNA 合成酵素活性などといった複雑な活性を持った人工リボザイムを創製することに成功している⁷⁾。核酸の進化分子工学実験と異なり、ランダム配列ライブラリーから出発する人工蛋白質創出実験は、Szostak らのグループが、80残基長の 6×10^{12} の多様性を持ったライブラリーからATP結合活性を持ったペプチドを創製することに成功した報告に限られている⁸⁾。

蛋白質の配列空間の大きさは、その蛋白質の長さに依存する。たとえば、7残基長からなるペプチドの持つ配列空間の大きさは $20^7 = 1 \times 10^9$ の多様性となり、このサイズであると実験室のなかで、すべての配列空間を探索することが可能であることがわかる。現在のところ、ナイーブなライブラリーから出発する進化分子工学では、7残基～12残基(4×10^{15} の多様性)のランダム配列を持ったファージペプチドライブラリーから、特定の標的分子に結合する人工ペプチドを創製する実験が広く利用されているのが現状である⁹⁾。

図 1 Structures of natural dimeric insulin(left) and engineered monomeric insulin¹²⁾(right). Two identical subunits are colored in green and brown, respectively. Mutated amino acids are colored in red.

以上、特定遺伝子にランダムに変異導入する戦略と、ランダム配列集団といったナイーブなライブラリーから出発する戦略の二つの典型例を示した。実際には、両者の間は連続しており、親遺伝子の特定部分だけをランダム配列にしたライブラリーや、完全にランダムなのではなく、ある程度バイアスのかかったパターン化されたナイーブライブラリーなど、いろいろなハイブリッド型が考案されている。

ここでは詳しく紹介しないが、蛋白工学(プロテインエンジニアリング)も、進化分子工学とは別の戦略で人工蛋白質を創製する重要なアプローチである³⁾。進化分子工学では、とにかく可能性のある解答(配列)をたくさん準備しておき、そのなかから本当の解答を持つものを選択によって探しだそうとする、ある意味“とれたもの勝ち”の非合理的な戦略であるのに対し、蛋白工学では、蓄積した蛋白質の構造と機能に関する知識をよりどころに、合理的に蛋白質を改変しようとする戦略である。やはり、進化分子工学と蛋白工学もある意味で連続しており、合理的に絞られた蛋白質のある領域だけをランダム配列化して、そのなかから目的のクローンを探すといったハイブリッド型の研究が多く存在する。

人工蛋白質製剤

いわゆる DNA 組換え技術を用いた蛋白質製剤の第一号は、インシュリン¹⁰⁾であり、その米国における認可は、いまから約 20 年前の 1982 年のことである。その後、現在までに 144 種の蛋白質製剤が欧米で承

図 2 Schematic structure of a chimeric protein drug¹³⁾ between a ligand binding domain of TNFR(green) and a Fc domain of IgG(yellow).

図 3 Strategies for development of protein drugs, which are classified as “rationality vs selection” and “*de novo* synthesis vs modifications of natural proteins”.

図 4 Creation of artificial proteins by **MolCraft**²⁶⁾. In **MolCraft**, functional motifs are first encrypted into different reading frames of a single microgenes. This microgene is then polymerized in tandem by MPR²¹⁾, which randomly shifts reading frames at junctions of a microgene unit. The translational proteins of resultant microgene polymers, therefore, have a combinatorial nature composed of three peptides coded by a single microgene.

図 5 Fictionalization of carbon nanohorns(gray)³⁹⁾. For this purpose, the artificial proteins that recognize carbon nanohorns and endow them biological functions. It is known that carbon nanohorns small molecules within them through their nano windows⁴⁰⁾.

蛋白質製剤がインシュリンからはじまったように、人工蛋白質製剤の第一号もやはり改変インシュリンであった。高濃度で多量体を形成してしまうといった天然インシュリンの欠点を、蛋白工学的な手法で改変したもの¹²⁾がそれで、超速効型インシュリンとして欧米で1996年、日本でも2001年に新薬承認されている。その後もいくつかの種類の改変型インシュリンが承認されているが、いずれも1~2残基のアミノ酸が置換されている比較的保守的な改変体であり(図1)、“人工蛋白質”と謳うにはいささか物足りないかもしれない。

より大胆な改変を施した人工蛋白質製剤としては、TNFRのリガンド結合ドメインとIgGのFc部分を融合させた関節リウマチ治療薬¹³⁾、Enbrel(1998年米国承認)(図2)や、ジフテリアトキシンとIL-2の融合蛋白質で皮膚T細胞リンパ腫の治療薬¹⁴⁾であるOntak(1999年米国承認)がある。変わりどころでは、12種類のサブタイプのコンセンサス配列から創り出した完全人工インターフェロン α ¹⁵⁾、Infergen(1997年米国承認、2001年日本承認)があげられ

認されており、500種以上が治験段階にあるとされている¹¹⁾。蛋白質製剤は、薬として開発するにはリスクが大きすぎるといった考えも根強いが、バイオ製剤の現在での世界市場の規模が3兆円に達していることや、新規承認されるバイオ製剤の数が、化学化合物ベースの薬のそれと同じオーダーに迫っている事実から考えると、今後ますます蛋白質をベースとした創薬が盛んになると考えてよいであろう¹¹⁾。現在、承認されている144種の蛋白質製剤のなかにも、すでに“人工蛋白質製剤”がいくつか含まれているので紹介してみたい。

る。また、現在つぎつぎと承認されつつある、いわゆるモノクローナル抗体医薬の多くも、蛋白工学的な“ヒト化(ヒト抗体を土台にして抗原認識部分のみをマウス抗体などから移植する)”処理¹⁶⁾を施されたものであり、人工蛋白質製剤の範疇にいられてよい。

このようにみえてみると、いくつかすでに承認されている人工蛋白質製剤は、いずれも“蛋白工学的”に合理的に天然蛋白質を改変したものである。進化分子工学的に創製された人工蛋白質製剤がまだ市場にあらわれていない理由として、① 進化分子工学が本格化したのが90年代初頭であり、蛋白工学がはじまった80年代はじめより10年のギャップがあることと³⁾、② 人工蛋白質製剤に関しては、開発から承認まで時間がかかること(組換えインシュリンが論文発表されたのが1979年¹⁰⁾で、新薬承認されたのが3年後の1982年であるのに対して、改変型インシュリンが認可されるには、その研究発表が出版された1988年¹²⁾から8年を必要とした)などがあげられる。特に天然の構造から大きくかけ離れた人工蛋白質製剤の場合には、安全性の確認にかなりの時間がかかるのはしかたのないことであろう。同じような理由で、アンチセンスRNA製剤の場合も、数多くの開発が治験レベルで停滞しており、認可された製剤はたった一つにとどまっている¹¹⁾。

唯一、広い意味での進化分子工学的な手法で作製された承認済み蛋白質製剤が、2002年に米国で認可されたアボット社のHumiraであろう。これは、関節リウマチの治療薬として用いられるヒトモノクローナル抗体で、進化分子工学で用いられるファージ提示法を用いて単離された抗体遺伝子^{17,18)}を用いて開発された抗体製剤である。

プロテオーム時代を迎えた人工蛋白質研究

ヒトゲノムの配列決定につづき、現在、蛋白質の構造・機能に関する網羅的解析を目指したプロテオーム研究が世界的規模で進められている。このような状況のもと、これまでの人工蛋白質研究はどのように新たな展開をみせ、また蛋白質製剤の開発にどのような影響を持つのであろうか¹⁹⁾。

人工蛋白質研究には“選択”を重視する“進化分

子工学”と“合理的設計”を重視する“蛋白工学”があると前述した。さらに、“親遺伝子の改変”か“まったく新しく(*de novo*)創製”するかの戦略の違いがあることも述べた。この“選択”と“合理性”を縦軸に、“改変”と“*de novo*”を横軸に、人工蛋白質研究をいま一度整理してみたい(図3)。“選択”を重視して“*de novo*”に人工蛋白質を創り出そうとするのがナイーブなランダムペプチドライブラリーから機能体を選択する戦略で、ファージペプチド提示系などで、すでに汎用的にいろいろな分野で利用されている。エリスロポイエチンと同じ活性を持った人工ペプチドなどは、基礎研究としてはかなり早い段階で創製されている²⁰⁾。このような人工ペプチドの創薬・診断薬分野での実用化も近い将来に実現するのかもしれない。

進化分子工学的に天然蛋白質を改変する領域では、DNAシャッフリング技術^{21,22)}といった強力な変異集団作製法を握る米国ベンチャー、Maxgen社²³⁾が蛋白質製剤、工業用酵素、ワクチンの開発などで大規模に研究を展開している。このなかでもインターフェロン- β や α の進化分子工学的改変体は、次世代インターフェロンとしての活躍が期待される。“合理的”に“天然蛋白質”を改変するのが超速効型インシュリンに代表される蛋白工学の戦略であるが、現在では蛋白工学に進化分子工学的要素を加えた、すなわち、蛋白質上の改変ターゲットを合理的に絞ったうえで、その範囲での可能な変異体集団ライブラリーを準備し、そのなかから目的のクローンを選択するといったハイブリッド型の実験²⁴⁾が中心となりつつある。合理的に*de novo*に蛋白質を設計する研究は、まだまだペプチドなどの小さな分子に限られているのが現状である²⁵⁾。

プロテオーム研究が本格化するにつれて、① 地球上に存在する全天然蛋白質のカタログ化、② 蛋白質の構造と機能に関するゲノム知識の獲得、が加速度的に進むと期待される。人工蛋白質製剤を考える場合には、ゲノム知識をいかに有効に活用するかがポイントとなるので、図3で示した分類での“合理性”の軸が重要な因子となってくるであろう。“カタログ化された天然蛋白質資源を材料”にして、蛋白質の構造と機能に関する“ゲノム知識に立脚”し、天然

蛋白質を越える機能を持った人工蛋白質を“人為再構成”することが、ゲノム時代の人工蛋白質製剤研究に求められる姿である。

階層的進化を模した進化学, MolCraft

現在、天然蛋白質の改変から人工蛋白質を創製する場合、部分的なアミノ酸の置換、ファミリー蛋白質間での分子育種(DNA シャッフリング)、不要部分を欠失させた小型化、異種蛋白質間でのキメラ形成などの手法が利用されている。いずれもどちらかといえば保守的な改変である。ナイーブライブラリーからの *de novo* 創製技術を用いれば、天然にはまったく存在しない新しい人工ペプチドが創製できることをすでに述べたが、現状では“結合活性”を持った短い人工ペプチドを創製する範囲にとどまっている。なにより、*de novo* 創製では蓄積したゲノム知識を有効に活用することができない。

筆者らはすでに、短い機能モチーフをブロック単位として用い、これを組み合わせることから人工蛋白質ライブラリーを調製する手法、**MolCraft**を開発した²⁶⁾。ペプチドライブラリーでは、アミノ酸(塩基)をブロック単位として、そのランダムな重合体からナイーブなライブラリーが調製された。**MolCraft**ではナイーブなライブラリーを調製するのではなく、あらかじめ特定の機能や構造に関連した、原始遺伝子ともいえる“マイクロ遺伝子”をブロック単位として用い、その重合から複数の機能や構造単位がいろいろな順番で連結した、特定の方向にバイアスのかかったライブラリーを調製する。また、蛋白質の構造形成を補助するために、“繰返し性”を重要視しているのも特徴で、天然の蛋白質に繰返し性が顕著な事実と²⁷⁾、任意に選ばれたペプチド配列の繰返しから、高頻度に天然の蛋白質の持つ物性に似た人工蛋白質が生まれる観察事実^{28,29)}に基づいて構築された新しい人工蛋白質創製手法である。

MolCraftによる人工蛋白質創製の概略を図4に示す。**MolCraft**で用いるブロック単位のマイクロ遺伝子は一つのみであり、目的に応じてそのつどデザインする。一つのマイクロ遺伝子であるが、DNA が読み枠をずらして3種のペプチドをコードできること

を利用して、複数の構造や機能に関連したペプチドを、複数の読み枠に埋め込むといったデザインを進める。機能モチーフは、プロテオーム研究から明らかとされるいろいろな蛋白質のモチーフを用いることもできるし、あるいは、ファージペプチド提示実験などから人工的に創製される人工モチーフを利用することもできる。構造モチーフは、天然の構造モチーフを利用することもできるし、あるいは、機能モチーフをコードするDNA配列の隠れ読み枠に埋め込むことも可能である³⁰⁾。

このようにして目的に応じて、構造や機能を単一マイクロ遺伝子の複数の読み枠に合理的に潜源化させ、つぎにこの単一マイクロ遺伝子を、MPR法³¹⁾とよばれる特殊な方法で読み枠をランダムにずらしながら重合化していく。得られたライブラリーは、単一マイクロ遺伝子がコードする三つの翻訳読み枠がいろいろな順番で出現する分子多様性を持つことになる。合理的に構造や機能をマイクロ遺伝子のなかに埋め込んではいないものの、どのモチーフがどのような数で、どのような順番で出現する場合に最も狙った活性を再構成できるかについては、まだまだ予測不可能な部分である。“蛋白工学”的に合理的にマイクロ遺伝子をデザインし、“進化分子工学”的に分子多様性集団のなかから期待した活性を持つものを選択するといった、蛋白工学と進化分子工学のハイブリッドのような性質を持つのが特徴である。

前述したEnbrel¹³⁾やOntak¹⁴⁾は、天然蛋白質のサブドメインを人為再構成することにより、天然には存在しない機能の組み合わせを持つ人工蛋白質を創製し、これを蛋白質製剤に利用した例である。**MolCraft**では、このような人為再構成を、サブドメインより小さなマイクロ遺伝子(モチーフ)単位で行おうとするものである。

現在、信号伝達系因子からはいろいろなモチーフ配列が同定されている。また、オルガネラ標的モチーフや細胞接着モチーフなど、人為再構成の対象となるモチーフ配列はプロテオーム研究から加速度的に蓄積されつつある。また、臓器ホーミングペプチドや人工リガンドなどもつぎつぎと創製されているので、これらの天然、人工の機能モチーフをうまく組み合わせ、新しい蛋白質製剤につなげるのが**Mol-**

Craftに課せられた現在の課題である。

人工蛋白質と DDS, ナノバイオテクノロジー

最後に **MolCraft** を用いた, 人工蛋白質の DDS, ナノバイオテクノロジー分野での利用を紹介したい。

進化分子工学的な *de novo* 創製の中心となっているファージペプチド提示系は, もともと蛋白質などの生体高分子をターゲットとして, これに特異的に結合するペプチドを創製する技術として発展してきた。ところが近年, このファージペプチド提示系が, 生体高分子以外の無機材料に対しても利用できることがわかってきた。最初の例は Belcher AM らのグループによる半導体無機結晶に結合するペプチド配列の単離である³²⁾。ここでは, GaAs (100), GaAs (111) A, GaAs (111) B, InP (100), Si (100) などの半導体に結合するペプチドが単離されている。Belcher らの論文につづき, 硫化亜鉛³³⁾, 銀³⁴⁾, カーボンナノチューブ³⁵⁾, カーボンナノホーン³⁶⁾, チタン³⁷⁾などに結合するペプチドがづぎづぎと単離されてきており, これら人工ペプチドが天然の蛋白質機能と無機材料の新たな出会いの場を提供し, 無機・有機ハイブリッド材料の開発に新展開をもたらすものと期待されている。

筆者らは, **MolCraft** を用いて “カーボンナノホーンの DDS 分野での利用” の実現を目指した研究を進めている³⁸⁾。カーボンナノホーンは, カーボンナノチューブの発見者でもある飯島澄男博士により, 1999 年に発見された新しいタイプのナノカーボン化合物である³⁹⁾。カーボンナノホーンの特徴は, 内部に低分子化合物を吸蔵できることであり⁴⁰⁾, この性質を利用し新しいタイプの DDS が開発できる可能性がある。これを実現するためには, カーボンナノホーンを認識し, 特異的な臓器に送達する人工蛋白質が必要となる (図 5)。

特異的な臓器に送達する人工ペプチドについては, 既存のペプチドを利用するとして, カーボンナノホーンを認識するペプチドに関しては, 天然の蛋白質のなかにその活性を求めることは難しく, 新たに進化分子工学的に創製することが求められる。そこで筆者らは, カーボンナノホーンをバイオチン化し

て固相化³⁶⁾することから一連の分子生物学的手法が利用できるようにし, ファージペプチド提示系を用いることにより, カーボンナノホーンを特異的に認識する人工ペプチドを単離することに成功した (加瀬・芝, 投稿準備中)。

現在, このカーボンナノホーン認識ペプチドと臓器ホーミングペプチドなどをマイクロ遺伝子に埋め込み, カーボンナノホーンの高機能化を目指した人工蛋白質創りがはじまっている。このように人工蛋白質は, 無機材料と既存の生物機能を融合させる材料としても注目されつつある^{41,42)}。

おわりに

最初の人工蛋白質製剤である改変型人工蛋白質が日本で承認されたのが 2001 年であり, その原理研究が発表¹²⁾されてから実用化まで 13 年が必要であった。コンセンサス人工インターフェロン $\alpha^{15)}$ の場合には, 日本での輸入承認まで 15 年を要している。

ここで紹介したような, より大胆な (天然蛋白質からかけ離れた) 人工蛋白質製剤が世に出るには, さらに時間を必要とするのかもしれないが, 人類の共通資産であるゲノム知識を有効に活用するためにも, ゲノム知識の人為再構成^{15,41,43)}をベースにした人工蛋白質製剤の息の長い研究が望まれる。

文 献

- 1) 伏見 譲: 進化分子工学とは, 化学と生物 37: 678-684, 1999.
- 2) 西垣功一: 動きだした進化分子工学, 蛋白質 核酸 酵素 43: 787-792, 1998.
- 3) 芝 清隆: 遺伝子を創る一遺伝子誕生の謎に分子進化工学が迫る, 科学 67: 938-947, 1997.
- 4) 芝 清隆: 出発点の選択—原始遺伝子, 生命の起源と進化の物理学, (伏見 譲・編), 共立出版, 東京, 2003, p 143-163.
- 5) 内山秀文: 進化分子工学による酵素の高安定化, 生体ナノマシンの分子設計, (城所俊一・編), 共立出版, 東京, 2001, p 205-223.
- 6) 山岸明彦: 進化分子工学的手法による蛋白質の耐熱化, 生物物理 36: 144-148, 1996.
- 7) 齋藤博英, 渡辺公綱, 菅 裕明: 試験管内分子進化法を用いて生命の起源を探る, 蛋白質 核酸 酵素 47: 1209-1214, 2002.
- 8) Keefe AD, Szostak JW: Functional proteins from a random-sequence library, Nature 410: 715-718, 2001.
- 9) Zwick MB, Shen JQ, Scott J: Phage-displayed peptide libraries, Curr Opin Biotechnol 9: 427-436, 1998.
- 10) Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG et al.: Expression in Escherichia coli of chemically

- synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 : 106-110, 1979.
- 11) Walsh G : Biopharmaceutical benchmarks-2003. *Nat Biotechnol* 21 : 865-870, 2003.
- 12) Brange J, Ribel U, Hansen JF, Dodson G, Hansen MT et al. : Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* 333 : 679-682, 1988.
- 13) Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmer KE et al. : Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151 : 1548-1561, 1993.
- 14) Waters CA, Schimke PA, Snider CE, Itoh K, Smith KA et al. : Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Receptor binding requirements for entry of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein into cells. *Eur J Immunol* 20 : 785-791, 1990.
- 15) Altrock BW, Fagin KD, Hockman HR, Fish EN, Goldstein L et al. : Antiviral and antitumor effects of a human interferon analog, IFN- α Con1, assessed in hamsters. *J Interferon Res* 6 : 405-415, 1986.
- 16) Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G : Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332 : 323-327, 1988.
- 17) Lerner RA, Kang AS, Bain JD, Burton DR, Barbas III CF : Antibodies without immunization. *Science* 258 : 1313-1314, 1992.
- 18) Winter G, Milstein C : Man-made antibodies. *Nature* 349 : 293-299, 1991.
- 19) 芝 清隆 : ゲノム時代の人工タンパク質研究. 日本農芸化学会誌 77 : 655-658, 2003.
- 20) Livnah O, Stura EA, Johnson DL, Middleton SA, Mulcahy LS et al. : Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist : the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science* 273 : 464-471, 1996.
- 21) Stemmer WPC : Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370 : 389-391, 1994.
- 22) Cramer A, Raillard SA, Bermudez E, Stemmer WPC : DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* 391 : 288-291, 1998.
- 23) <http://www.maxygen.com>
- 24) Wells JA, Vasser M, Powers DB : Cassette mutagenesis : an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene* 34 : 315-323, 1985.
- 25) 小幡谷育夫, 三原久和 : ペプチド立体構造の設計. 生体ナノマシンの分子設計. (城所俊一・編), 共立出版, 東京, 2001, p 122-140.
- 26) 芝 清隆 : **MolCraft**—階層的進化を模した人工蛋白質創出法. 蛋白質 核酸 酵素 48 : 1503-1510, 2003.
- 27) 芝 清隆 : 蛋白質にひそむくり返し構造—くり返し原理による人工蛋白質の試み. 蛋白質 核酸 酵素 46 : 16-25, 2001.
- 28) Shiba K, Takahashi Y, Noda T : On the role of periodism in the origin of proteins. *J Mol Biol* 320 : 822-840, 2002.
- 29) Shiba K, Shirai T, Honma T, Noda T : Translated products of tandem microgene repeats exhibit diverse properties also seen in natural proteins. *Protein Engn* 16 : 57-63, 2003.
- 30) 芝 清隆 : マイクロ遺伝子のタンデム重合. コンビナトリアル・バイオエンジニアリング. (植田充美, 近藤昭彦・編), 化学同人, 京都, 2003, p 67-71.
- 31) Shiba K, Takahashi Y, Noda T : Creation of libraries with long open reading frames by polymerization of a microgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 3805-3810, 1997.
- 32) Whaley SR, English DS, Hu EL, Barbara PF, Belcher AM : Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* 405 : 665-668, 2000.
- 33) Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM : Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science* 296 : 892-895, 2002.
- 34) Naik RR, Stringer SJ, Agarwal G, Jones SE, Stone MO : Biomimetic synthesis and patterning of silver nanoparticles. *Nat Mater* 1 : 169-172, 2002.
- 35) Wang S, Humphreys ES, Chung SY, Delduco DF, Lustig SR et al. : Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nat Mater* 2 : 196-200, 2002.
- 36) Zhu J, Kase D, Shiba K, Kasuya D, Yudasaka M et al. : Binary nanomaterials based on nanocarbons : a case for probing carbon nanohorns'biorecognition properties. *Nano Lett* 3 : 1033-1038, 2003.
- 37) Sano K, Shiba K : A hexapeptide motif that electrostatically binds to the surface of titaninm. *J Am Chem Soc*, 2003, (in press).
- 38) 芝 清隆 : ナノカーボン分子のバイオ分野への応用. 工業材料 51(1) : 47-50, 2003.
- 39) Iijima S, Yudasaka M, Yamada R, Bandow S, Suenaga K et al. : Nano-aggregates of single-walled graphitic carbon nano-horns. *Chem Phys Lett* 306 : 165-170, 1999.
- 40) Bekyarova E, Kaneko K, Kasuya D, Takahashi K, Kokai F et al. : Pore structure and adsorption properties of single-walled carbon nanohorn bud-like aggregates treated in different atmospheres. *Physica B* 323 : 143-145, 2002.
- 41) 芝 清隆 : 遺伝子を利用したバイオナノテクノロジー : 天然遺伝子, 人工遺伝子を用いた結晶成長制御. 現代化学 390 : 12-18, 2003.
- 42) Shiba K, Honma T, Minamisawa T, Nishiguchi K, Noda T : Distinct macroscopic structures developed from solutions of chemical compounds and periodic proteins. *EMBO Reports* 4 : 148-153, 2003.
- 43) Shiba K : *In vitro* constructive approaches to the origin of coding sequences. *J Biochem Mol Biol* 31 : 209-220, 1998.