

1P065

Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法に基づくペプチドライブラリーの構築

○橋崎 真介¹、北村 幸一郎¹、木下 保則¹、小林 輝章²、根本 直人²、西垣 功一¹ (1 埼玉大学・工、2(株)ジェンコム)

タンパク質を高速進化させる方法論の一貫で制御的多様性ライブラリー実現法として我々は Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法を開発した。先行研究において緑色蛍光タンパク質 (GFP) をモデル分子として YLBS を行い、ライブラリーの完全性 (すべての要素を含むこと) が確認でき全体を通しての方法論の有効性が示された。

本研究ではトリヌクレオチドをブロックとして 8 ブロック、16 ブロック連結 DNA ライブラリーを構築した。今回ブロックとして 7 種類と 20 種類のアミノ酸に対応するトリヌクレオチド (コドン) を出発材料としてライブラリーを作成した。前者では 16 ブロックライブラリー (多様性 $7^{16} \approx 3.3 \times 10^{13}$)、後者では 8 ブロックライブラリー (多様性 $20^8 \approx 2.56 \times 10^{10}$) において実験室スケールの DNA 量 ($10^{13} \sim 10^{14}$ 分子) で全多様性を実現している。これまでの実験で明らかになってきた「欠失現象 (最終的連結産物の塩基配列から、時としてブロック領域の一部に欠失が見られる現象で、主として PCR 処理と制限酵素処理に由来すると考えられている)」に対するいくつかの改善策を報告し、最終目的である「ペプチドライブラリー」としてのクオリティ等を報告する予定である。

S.Narazaki, K. Kitamura, Y. Kinoshita, T. Kobayashi, N. Nemoto and K. Nishigaki : Construction of a peptide library by way of YLBS (Y-ligation based block shuffling)

1P067

軽鎖を除去または交換したアクチン-S1 複合体の ADP による構造変化の X 線回折

○岩本 裕之¹、大岩 和弘²、若山 純一¹、藤澤 哲郎³ (1SPring-8・JASRI、2 通信総合研究所・生体物性、3 理研播磨研究所・構造生物化学)

アクチンとニワトリ砂囊平滑筋 S1 の複合体は rigor 状態から ADP を結合すると軽鎖ドメインの向きを変えると報告され、また X 線回折パターンも大きく変化する。しかしウサギ骨格筋では軽鎖結合部位の向きが変わらず、X 線回折パターンの変化は遥かに小さい。本実験の目的は (1) ADP 結合時のアクチン-S1 複合体の構造変化が軽鎖結合部位のみで起こるのか、モータードメインも含むのかを検証することと、(2) 各種の修飾を行った軽鎖をネイティブのものや交換した際のアクチン S1 複合体の構造変化を調べるため、軽鎖交換の技術を確認することである。砂囊平滑筋 S1 の軽鎖交換は一般に困難で、従来法では交換反応を高温 (40 °) で行う必要があったので、高温で分解するようなラベルで修飾を行うことはできなかった。今回 Sweeney らの方法を平滑筋 S1 に用いられるよう改良したところ、氷上で軽鎖の交換ができることが判明した。交換は蛍光ラベルした制御軽鎖により確認した。まず軽鎖抽出の条件ではアクチン第 6 層線反射のピークは外側に、第 5 層線のダブルピークはシングルピークになって全体が内側に移動するとともに増強した。後者の変化は ADP を加えたときの変化と類似する。抽出時の回折像の変化は骨格筋 S1 を用いた場合も基本的に同様であった。軽鎖を抽出した平滑筋 S1 に ADP を加えても反射の変化はネイティブな S1 の場合に比べて遥かに小さかった。一方軽鎖を交換したものは第 6 層線の位置は変化せず、ADP を加えるとネイティブな平滑筋 S1 の場合と同様の大きな変化が第 5 層線に見られた。以上から、制御軽鎖は交換操作後正しく S1 と結合しているらしいこと、また ADP を加えたときに見られるアクチン-S1 の X 線回折像の大きな変化は大部分が軽鎖ドメイン部分の構造変化に由来することが判った。

H. Iwamoto, K. Oiwa, J. Wakayama and T. Fujisawa. : X-ray diffraction study of the structural changes upon addition of ADP in actin-S1 complex after light chain removal or exchange.

1P066

In vitro DNA virus: 無細胞自律進化系へ向けて

○田淵 一郎¹、空本 清香¹、根本 直人²、伏見 謙¹ (1 埼玉大・工、2(株)ジェンコム)

進化分子工学は、新規機能性分子の取得においてその有用性を示してきた。蛋白質にダーウィン進化原理を適用するには遺伝子型と表現型の対応付けが必要である。ウイルス型対応付け戦略は、遺伝子型分子 (DNA 又は RNA) と表現型 (蛋白質) を、ウイルス粒子の場合と同じく直接に結合させるものである。ファージ・ディスプレイとセルスタットはこの戦略を実験室内進化実験に適用する為に開発された。in vitro virus はこの戦略の無細胞版である。mRNA 3' 末端にビューロマイシンを付ける事で新生蛋白とそれをコードする mRNA をリボゾーム上で翻訳中に共有結合させることができる。無細胞系を用いるのでライブラリーの多様性と系の柔軟性を大幅に上げることができる。我々は新規な構成の in vitro DNA virus を報告する。このウイルス粒子は、cDNA と蛋白質とが共有結合したもので構成される。ビューロマイシンリンカーと逆転写用 DNA プライマーを T 型に結合した T-linker-primer を用いることを特長としており、テンプレート mRNA の修飾を必要としない。また、遺伝子型が安定な DNA である為、より厳しい条件下での淘汰を行える。設計通りのウイルス粒子の形成と、His タグと Flag エピトープとを用いた試験系における効率的な選択的増幅実験に成功している。テンプレート修飾を必要としない in vitro virus は、セルスタットにおけるウイルス進化実験の無細胞版となりうる。すなわち、無細胞自然淘汰型進化リアクターへ発展できるだろう。

I. Tabuchi, S. Soramoto, N. Nemoto, Y. Husimi : In vitro DNA virus for in vitro autonomous protein evolution.

1P068

コントラスト変調法による骨格筋線維の X 線回折像の解析

○若山 純一¹、藤澤 哲郎²、岩本 裕之¹ (1SPring-8・JASRI、2 理研播磨研究所・構造生物化学)

筋肉は内部の蛋白分子の規則的配列に由来する多くの X 線反射を生じる。単一の反射の中でも部位によって寄与する蛋白種が異なり、また単一の蛋白が多数の反射に寄与する場合でも反射によって主に寄与する蛋白ドメインが異なる可能性がある。これらの可能性を検討するため、異なる蛋白種やドメインの電子密度が異なることを利用し、sucrose 添加により増した溶媒の密度と反射強度の関係を求めること (コントラスト変調法) で各反射の起源を調べた。試料にはウサギ脱膜骨格筋線維 (弛緩または硬直状態) をフルオーバーラップで用いた。弛緩状態では sucrose の添加によりミオシンの螺旋が乱されるため、ミオシン層線反射のマッチング濃度 (反射強度が 0 になる sucrose 濃度) を求めることはできなかった。しかしアクチン第 6 層線 (1/5.9nm-1) は安定で、この層線のマッチング濃度は 67% であった。硬直状態ではいずれの反射も安定で、多くの反射についてマッチング濃度を決定することができた。第 6、7 層線を除くアクチン各層線反射の強度は殆どアクチンに結合したミオシン頭部に由来すると考えられるが、これらの層線反射 (第 1-5) のマッチング濃度はいずれも 50-55% であった。第 6 層線のうちでミオシン頭部の寄与が大きいと考えられる内側のマッチング濃度は約 56%、アクチンの寄与が大きいと考えられる外側では 61% であった。興味深いのはミオシン由来子午線反射で、1/14.5nm-1 反射のマッチング濃度が 57% であったのに対し、1/7.2nm-1 反射の場合は 68% であった。従って 1/7.2nm-1 反射に対してはミオシン頭部よりも電子密度の高い部分の寄与が大きい可能性がある。以上のようにコントラスト変調法は各反射の起源を詳細に調べる上で有効な手段と考えられる。

J. Wakayama, T. Fujisawa and H. Iwamoto : Origin of X-ray reflections from skeletal muscle fibers as examined by contrast variation.