

2P41

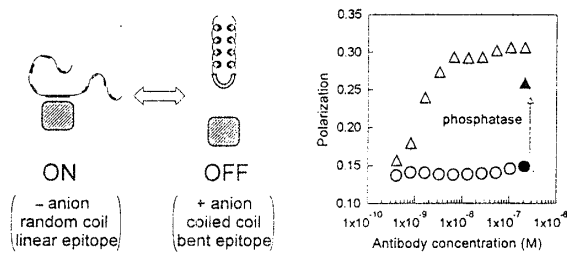
ペプチドの構造変化を利用した抗原抗体反応のアロステリック制御

○片倉啓雄、宮崎貴弘、大政健史、後藤祐児¹、香健一
(大阪大院・工・応生、¹阪大院・理・生物)

【目的】(LLKK)_nの繰返し配列を持つペプチドは、アニオン、特にポリアニオンによって逆平行ヘリックス構造が誘導される(Y. Goto & S. Aimoto (1991) *J. Mol. Biol.*, **218**, 387-396)。本研究ではこの繰返し配列に抗体のエピトープ配列を挟み、アニオン濃度による抗原抗体反応のアロステリックな制御を試みた(左図)。

【方法】AG(KKLL)_nDTYRYI(LLKK)_nGAC (n=0,3,4,5)を固層合成し、DTYRYIを認識するAU1抗体は市販品をアフィニティ精製して用いた。親和定数は10 mM Tris-Cl (pH 7.5)中で蛍光偏光法で測定した。

【結果】n=3,4,5のペプチドは41 μMのtriphosphate (TP)によってαヘリックスを形成した(123 μM monophosphateではランダムコイル)。親和定数は41 μM TPの添加によってn=3の時1/10、n=4,5の場合は1/1000以下に低下した(右図はn=4の場合、○, ●, 41 μM TP; △, 0 μM TP)。また、TPをphosphataseによって分解すると抗体は再びペプチドに結合した(●→▲)。アロステリック蛋白ではエフェクターの結合による構造変化が第2の分子との親和性を制御している。TPをエフェクター、抗体を第2の分子と見なせば、本ペプチドはアロステリック蛋白の定義を満たしている。



Y. Katakura, T. Miyazaki, T. Omasa, Y. Goto, K. Suga: Allosteric control of an antibody-peptide interaction using a conformational change of the peptide.

2P43

蛋白質ブロックシャフリング技術(Y-連結法)の開発とその応用

○田口勝也、西垣功一
埼玉大学工学部

新規蛋白質の創製には、多くの未知蛋白質変異体集団を探索し、さらに変異・改良を重ねる進化分子工学が有効と考えられる。

この時、変異体集団にはランダム点突然変異体集団よりも、ブロックシャフリングによる組換え集団を用いる方が配列空間を大股歩行する場合に主として、i) 集団要素の制御可能性(特定の配列に限定可能)、ii) 終止コドンを避けるなどの配列設計性において優れている。

我々は、このための蛋白質ブロックシャフリング技術として、反応効率が高いY-連結法を開発した。これは、連結する2つのDNA断片を効率的に分子内反応とするための相補結合ステム部分(αまたはα⁻)と任意の配列部分(x)とから構成される。DNA (α-x, x'-α⁻; 5'→3')を基本とし、2種のDNAをT4 RNAリガーゼにより連結後、一方のステム部分を切除しα-x-x'とし、それに対し再び新たなDNA (x''-α⁻)をハイブリットし連結する。この過程を繰り返して、α-x-x'-x''-x'''-...を合成する。この過程でシャフルを実現する方法論である。

先ず実験材料として、ズブチリンを用い、8ブロックに分割したもののシャフリングを試みた。Y-連結法の収率向上問題、選択ブロックのサイズと配列問題を含め、シャフリングの結果について報告する。

K.Taguchi, K.Nisigaki: Development and Application of Protein Block Shuffling Technology: Y-Ligation

2P42

モジュール置換キメラヘモグロビンの結晶構造解析

○白井剛、田中道明、藤掛真広、山根隆、稲葉謙次¹、石森浩一郎¹、森島嶺¹、名古屋大・工¹、京大・工

天然タンパク質は、一次構造的にも立体構造的にも、モジュールやドメインといった構造単位の集合体とみなせる。このようなタンパク質の構造は、そのタンパク質が進化的ななかで、構造単位を様々に組み合わせた過程の痕跡と考えられる。どのようにタンパク質の部品を組み合わせると新規の機能を作り出せるか、という問題はタンパク質工学の問題でもあるが、工学的手法を大規模に適用したタンパク質の立体構造の解析はまだまだ少数である。本研究では、進化におけるタンパク質の構造および機能部品であるとされるモジュールを組み替えたヘモグロビンの構造解析を行った。昨年の年会では、ヒトヘモグロビンのβ鎖のモジュール4をα鎖のもので置き換え、さらに構造安定化のためのアミノ酸置換(F133V)施したキメラβ_α(F133V)ヘモグロビンの暫定的な構造解析の結果を報告した。精密化の完了した構造から、全体的に、モジュールの置換はサブユニット自身やその集合である四量体の構造を大きく変化させないことが分かった。また、βサブユニットに導入されたαのモジュール4の構造は、どちらかというβのものに近いことが示された。しかし、初期構造にβサブユニットを用いたことから、この結晶の分解能(2.5 Å)では原子位置の精密化が不十分に行われなかった可能性が高い。そこで現在、このキメラβ_α(F133V)ヘモグロビンの結晶構造の精密化を、NCS(非結晶学的対称性)を利用した方法により継続している。本年会ではその結果について報告する。また、モジュール置換がタンパク質の構造に与える影響を比較するために、モジュール3と4の境界付近(偽モジュール)で置換を行ったシュドモジュール置換キメラβ_αヘモグロビンの構造安定化のためのアミノ酸置換を施していないキメラβ_αヘモグロビンの結晶化および構造解析を行っており、その暫定的な結果についても報告する予定である。

T. Shirai, M. Tanaka, M. Fujikake, K. Inaba, K. Ishimori, I. Morishima: Crystal structure analyses of module substituted chimera hemoglobins

2P44

ギャップペナルティーにおける結合切断の指標(Cutlin)

○坂井 士(生命工研)

ギャップペナルティー(p)に含まれる結合・切断の指標(cutlin: cut&link) $t(i, j)$ を、蛋白質のアミノ酸残基(i)と(j)の類似度 $s(i, j)$ に整合する形で評価する新しい方法を提案する。

二つの物理的な自由度の間の関連の強さを表す結合定数と、われわれが定義するアミノ酸残基の類似度には、対角項の幾何平均で規格化するという形式上の一致が見られる。これを類推の根拠として、結合定数kと伝達率 η との関係^[1]と同様な関係が、類似度 $s(i, j)$ と結合・切断指標 $t(i, j)$ との間にも成立すると想定すれば;

$$t(i, j) = [1/s(i, j) - \{1/s(i, j)\}^2 - 1]^{1/2} \eta^2$$

これによる結合・切断の指標 $t(i, j)$ は、類似度の対称性^[2] $s(i, j) = s(j, i)$ を継承し、 $t(i, j) = t(j, i)$ である。

いくつかのギャップペナルティーを結合・切断指標 $t(i, j)$ を明記して書き換える。挿入配列(c...d)と欠失配列(k...l)をもつ二本のアミノ酸配列

$$\begin{matrix} (a..bc..de..f), \\ (i..jk..lm..n) \end{matrix}$$

を比較整理する場合、pの基本形式^[3]は;

$$-p = \{[s(c) + \dots + s(d)]/2 + [s(k) + \dots + s(l)]\} \\ + [t(b, e) + t(b, c) + t(d, e)]/4 + [t(j, m) + t(j, k) + t(l, m)]/2.$$

また、欠失配列(k...l)が挿入配列(c...d)と同じであると仮定して得られる可能な最大のギャップペナルティー^[4] p_{max} は;

$$-p_{max} = 3\{[s(c) + \dots + s(d)]/2 \\ + [t(b, e) + t(b, c) + t(d, e)]/4 + [t(j, m) + t(j, k) + t(l, m)]/2\}.$$

さらに、パラメータ (node fixing parameter) λ を含む場合^[4]は;

$$-p(\lambda) = \{[s(c) + \dots + s(d)]/2 + [t(b, e) + t(b, c) + t(d, e)]/4 \\ + [t(j, m) + t(j, k) + t(l, m)]/2 + \lambda \{[s(c) + \dots + s(d)] + [t(j, c) + t(d, m)]/2\}.$$

結合・切断指標 $t(i, j)$ を含むギャップペナルティーを適用して、二つの蛋白質の部分配列を例に、そのアミノ酸配列の比較整理を行ってみた。

長さを異にするアミノ酸配列の比較整理には、欠失配列が不確定であることに由来し、Steiner ratio (= $2/3^{1/2}$)で規定される範囲^[4]を限界とする、本質的なあいまいさが存在する。

- [1] 高橋秀俊・藤村 靖: 物理学講義-物理学汎論-丸善(1990), p. 49-52.
[2] T. Sakai: "Metrics for Protein Sequence Comparison", Proceedings of Genome Informatics Workshop IV, Yokohama (1993), p. 332-338.
[3] 坂井 士: 「アミノ酸配列の比較整理におけるギャップペナルティーの基本形式」, 第3回 日本蛋白質学会 年会, 大阪(1991), 要旨集, p. 46.
[4] 坂井 士: 「パラメータを含むギャップペナルティー」, 第4回 日本蛋白質学会 年会, つくば(1992), 要旨集, p. 76.

T. Sakai: Cutlin in gap penalty for protein sequence comparison