

シンセティックアプローチによる生物システム形成原理の探求

●芝 清隆

(財) 癌研究会 癌研究所

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム研究は成熟期を迎え、ポストゲノム研究からは、遺伝子やタンパク質の構造と機能に関する質の高い知識(ゲノム知識)が急速に蓄積しつつある。このようなゲノム研究の知的財産の有効的な活用法として、過去の研究で開発した繰り返しを原理とした人工タンパク質創製システム(MolCraft)を利用し、ゲノム知識を人工タンパク質上で人為再構成し活用する新しいコンセプトを具体化するのが本研究の目的であった。すなわち、ゲノム時代に呼応した人工タンパク質創製の新しい基盤技術の開発である。これは、ゲノム知識を活用し、天然には存在しない機能を持った人工タンパク質を創製することによって、人類の共有知的財産ともいえるゲノム知識を積極的に活用することができることを意味する。数年先に訪れるこのようなゲノム知識の人為再構成の時代に備えて、タンパク質レベルでの遺伝子プログラムの基盤技術を早い段階で確立しておくことは、ゲノム生物学研究のバイオテクノロジー分野への展開にとっても重要な課題であると考えられた。

進め方は、「機能」に関連付けられた「ペプチドモチーフ」を天然のタンパク質の中から抽出し、これを複数同時にマイクロ遺伝子と呼ばれる短いDNA配列の中に埋め込む—すなわち、ペプチドモチーフをコードする小さな人工遺伝子を設計することから開始し、次に、このマイクロ遺伝子を重合して大きな人工遺伝子を作製する。マイクロ遺伝子の設計時に、複数のペプチドモチーフを異なる翻訳読み枠に埋め込み、さらに、マイクロ遺伝子の重号時に、重合点で読み枠がランダムにずれる(すなわち、3の倍数性が崩れる)ように細工を施すことにより、得られる人工遺伝子は、複数のペプチドモチーフをコンビナトリアルに重合した分子多様性集団となる。

このような人工遺伝子ライブラリーからは、全体として繰り返し性が高い人工タンパク質が産生され、この繰り返し性が人工タンパク質にある程度の「構造」を与えるものと期待できる。それぞれのペプチドモチーフが、そのような数、どのようなコンテキストで出現すると、期待した活性がもっとも強く再構成できるかは、予測できない。したがって、ライブラリーからの選択といった、コンビナトリアルな操作が威力を発揮する。

マイクロ遺伝子に組み込むペプチドモチーフは天然由来のものに限られない。いわゆる進化分子工学的手法で取得された人工ペプチドモチーフも利用することができ、人工ペプチドモチーフと天然ペプチドモチーフの組み合わせは、これまでにないユニークな人工タンパク質の創製へとつながる。

〈研究開始時の研究計画〉

(1) マイクロ遺伝子に埋め込み可能な生物機能をゲノム研究の成果から抽出する：重合の単位として用いるマイクロ遺伝子はおよそ20bp~120bpを標準としている。埋め込みが可能な生物機能は40アミノ酸残基以内に特定の機能が関連付けられている機能に限られてくる。各種

信号伝達因子のもつモチーフ、金属沈着・金属イオン認識に関連したモチーフを中心に、ゲノム・プロテオーム研究の最新の研究を精査し、人為再構成可能な生物機能を採集する。信号伝達因子モチーフは新しい人工バイオシグナル分子の創製、また、金属沈着・金属イオン認識モチーフは、金属沈着活性をもつ人工タンパク質を創製し、バイオナノテクノロジー分野での利用研究へとつなげる。

(2) 多機能マイクロ遺伝子のデザイン：上のような生物機能を、単一のマイクロ遺伝子の異なる翻訳読み枠に埋め込むデザイン方法を確立する。マイクロ遺伝子のデザインには、機能モチーフと同時に、二次構造形成能力、疎水性度、pIなどのタンパク質の構造に関する情報も同時に埋め込むことが多い。複数の読み枠に複数の機能を埋め込むのは莫大な計算量を必要とする作業である。現在、アミノ酸をジペプチドに分解して高速にマイクロ遺伝子をデザインする新しいアルゴリズム(3特許申請)を開発しており、この第2世代のマイクロ遺伝子デザインツールの完成を目指す。

(3) マイクロ遺伝子重合法による人工タンパク質の作製：このようにしてデザインしたマイクロ遺伝子を出発材料に人工タンパク質を作製する。この段階は既に確立した「マイクロ遺伝子重合(MPR)法」を利用する。現在人為再構成が成功している、「アポトーシス信号伝達系を攪乱する自動細胞侵入型人工タンパク質」(文献1)「免疫誘導人工タンパク質」の派生株の作製と、その性質解析を中心とし、さらに新しい「細胞接着活性をもつマクロ構造形成タンパク質」の創製も進めていく

(4) 創出した人工タンパク質の性格決定：人工タンパク質の物理化学的、生物学的性質解析を進める。

〈研究期間の成果〉

2種の天然ペプチドモチーフを再構成する例として、アポトーシス誘導に関係したBH3モチーフと細胞移入に関連したPTDドメインを再構成し、細胞内に自動進入し細胞死を誘導する人工タンパク質が創製できた(文献1)。4種の天然ペプチドモチーフを再構成する例として、アポトーシスに関連したBH1-4モチーフを再構成する実験をおこなった。まず、この実験を可能とするために、従来のMolCraft法を改良する必要があった。なぜならば、従来のMolCraft法では、1つのマイクロ遺伝子の3つの翻訳読み枠に異なるモチーフを埋め込み、これをコンビナトリアルに組み合わせるといった手法を用いていたために、再構成できるモチーフの数が「3」以下に限定されていた。BH1から4の4つのモチーフをコンビナトリアルに重合するために、MolCraftの改良版ともいえるプロトコルを開発した。ここでは、複数のマイクロ遺伝子が、1対以上のオリゴヌクレオチドの確率的な塩基対形成から形成されるように細工を施し、理論上いくつでもモチーフをコンビナトリアルに重合できるようになっている。

この改良版MolCraftを利用し、BH1、BH2、BH

3、BH4モチーフがコンビナトリアルに重合した人工タンパク質ライブラリーを作製した。興味深いことに、この単一ライブラリーからアポトーシスを「正」「負」の両方向に制御するクローンがそれぞれ選択できた。アポトーシス信号伝達系に関するタンパク質の中で、BH1-4モチーフをもつものが多いが、それらは、アポトーシスを正・負、どちらに制御するものも含まれている。信号伝達慶賀、モチーフを中心にどのように進化してきたのかに対しても示唆を与える興味深い結果である（論文投稿中）。

〈国内外での成果の位置づけ〉

人工タンパク質の創出研究には、「蛋白質工学」研究と「分子進化学」研究が存在し、国内外にも優れた研究が数多い。「蛋白質工学」は構造と機能を同時にデザインしようとするため、深い知識が要求され汎用性に乏しい。「分子進化学」は汎用性の高い技術であるが、非合理的な創出戦略をとっているために、ゲノム知識の合理的な利用にはむいていない。この研究での人工タンパク質創出技術はこれらのいずれの範疇にも属さない第3世代の人工タンパク質創出技術である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

人工ペプチドとして、カーボンナノ化合物に結合するペプチドモチーフ、チタンに結合するペプチドモチーフの取得に成功した。これら人工ペプチドと天然ペプチドモチーフを組み合わせた人工タンパク質の作製もスター

トしたが、期間内には論文にまとまるまでに至っていない。人工タンパク質の発現・精製が、しばしば難しい場合があり、これを解決する（無細胞翻訳系などを用いる）のに時間を要したためである。

〈今後の課題〉

無機物に結合する人工ペプチドモチーフは、同時にその無機物のからんだ鉱物化（バイオミネラリゼーション）を促進することがわかってきた。無機物に結合する人工ペプチドと天然ペプチドモチーフを、われわれの方法で人工再構成することにより、天然には存在しない活性をもった人工タンパク質が創製できる。無機材料科学と生物学をインターフェイスする人工タンパク質といった、新しいコンセプトを実現するための研究を進めていきたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Saito H, Honma T, Minamisawa T, Yamazaki K, Noda T, Yamori T, Shiba K
Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs
Chem Biol 11(6): 765-773 (2004)
登録受付番号 0408160743
- 2) アミノアシル tRNA 合成酵素のゲノム空間内分布のデータベース：ARSA
登録受付番号 0202222127
- 3) 特許出願：多機能塩基配列の設計方法
登録受付番号 0202261436

