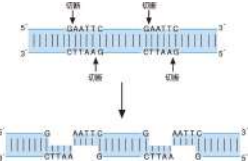


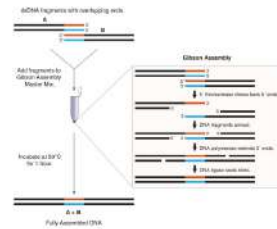
**DNAを使う実験技術：遺伝子工学**



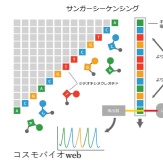
- 制限酵素**：特異的なDNA配列に結合し、ホスホジエステル結合を切断する。様々な配列を認識する制限酵素が見つかり、遺伝子工学におけるハサミとして利用される。
- リガーゼ**：ホスホジエステル結合をATP依存的に連結する。遺伝子工学におけるのりとして利用される。

**DNAを使う実験技術：遺伝子工学**

**シームレスクローニング**：  
新しいDNA連結技術。ギブソンアッセムブリなど。



**DNAを使う実験技術：DNA配列解析（シーケンス）**

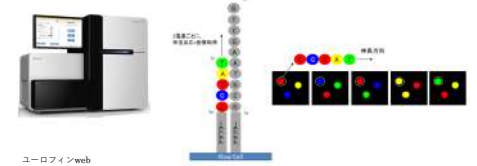


- DNA配列解析**はDNAの配列を決定するために行う。
- サンガー法**（チェーンターミネーション法）は最も一般的に用いられている。
- 試験管内でDNA伸長反応を行い、その際にジデオキシヌクレオチドを加えておき、それが取り込まれると反応は停止する。
- 停止したDNAを長さで分離すると、DNAの配列がわかる。

**DNAを使う実験技術：DNA配列解析（シーケンス）**

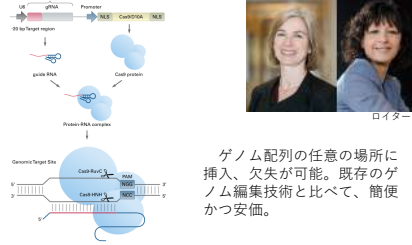
●**次世代シーケンス**（Next Generation Sequencing: NGS）  
様々な方法がすでに実用化されている（もはや次世代ではない）。

イルミナ：Sequence by Synthesis



**DNAを使う実験技術：ゲノム編集**

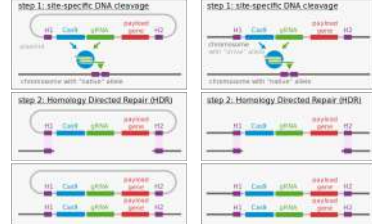
**Crispr/Cas9** クリッパー・キャスナイン  
ダウドナ（米）とシャムバルティエ（仏）が開発（2013年）



ゲノム配列の任意の場所に挿入、欠失が可能。既存のゲノム編集技術と比べて、簡便かつ安価。

**DNAを使う実験技術：ゲノム編集**

**Crispr/Cas9による遺伝子ドライブ**  
endogenous insertion propagation after sexual reproduction



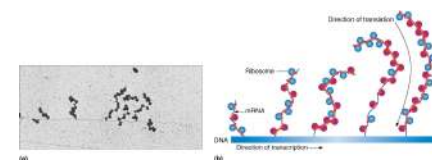
生殖できない蚊、オスしか生まれないネズミ。マラリアの根絶を可能にすると考えられるが、同時に種の絶滅が可能。

**タンパク質の合成**

**第19章**

概要

- **Section 19.1:** 遺伝暗号
- **Section 19.2:** タンパク質の合成
- タンパク質の工学応用：蛋白質デザイン・バイオ医薬品



**Section 19.1: 遺伝暗号**

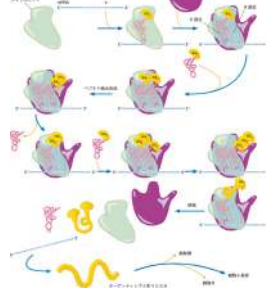
表 19.1 遺伝暗号  
二文字目がUだと疎水アミノ酸  
2番目

1番目	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Leu UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA Stop UAG Stop	UGU Cys UGC Cys UGA Stop UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Stop CAG Stop	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Stop AAG Stop	AGU Ser AGC Ser AGA Stop AGG Stop
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Stop GAG Stop	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

**Section 19.2: タンパク質合成**

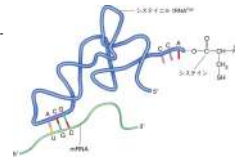
- 翻訳は3つの段階で表せる：開始、伸長、終結
- **1. 開始**—リボソームの小サブユニットがmRNAと結合し、開始tRNAがmRNAにある**AUG**に結合
  - 大サブユニットの結合で開始過程は終了
  - リボソームには、**P**（ペプチジル）部位と**A**（アミノアシル）部位があり、コドン アンチコドン相互作用に関わる
  - mRNAには多数のリボソームが結合（**ポリソーム**）
- **2. 伸長** — 遺伝情報に従ってポリペプチドを合成
  - mRNAの5'→3'方向にそって、タンパク質合成はN-末端からC-末端へ進む
  - A部位への次のtRNA結合、ペプチド結合形成、P部位への移動、の3ステップ

**Section 19.2: タンパク質合成**



**Section 19.1: 遺伝暗号**

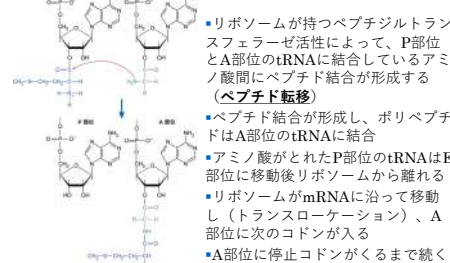
システイニル-tRNA<sup>Met</sup>のコドン-アンチコドン塩基対合



● **コドン アンチコドン相互作用**

- tRNAは翻訳時にアダプターとして働く
- tRNAがコドンに対応したアミノ酸を運ぶ
- 3文字目の認識は緩く、同じtRNAが異なったコドンで認識できる（**ゆらぎ仮説**）

**Section 19.2: タンパク質合成**



ペプチド結合の形成

**Section 19.1: 遺伝暗号**



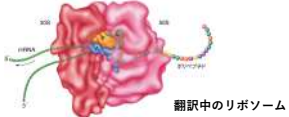
● **アミノアシル-tRNAシنتターゼ反応**

- アミノアシルtRNAシントターゼによってtRNAにアミノ酸が付加する。
- 20種類のアミノ酸に対して少なくとも1つのアミノアシルtRNAシントターゼがある

**Section 19.2: タンパク質合成**

- **3. 終結**—終止コドンにはアミノアシルtRNAが結合できないため、翻訳が終結する
  - タンパク質解離因子がA部位に結合し、リボソームがP部位にあるtRNAからポリペプチドを切り離す

Section 19.2: タンパク質合成



翻訳中のリボソーム

■原核生物でのタンパク質合成

- 原核生物ではアミノ酸重合を毎秒約20個の速度で行う
- 70Sリボソーム50S大サブユニットと30S小サブユニット（どちらもrRNAとタンパク質の複合体）

Section 19.2: タンパク質合成

■真核生物のタンパク質合成

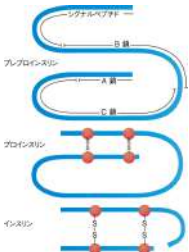
開始が大きく原核生物と異なる

■開始 原核生物より複雑

1. mRNAの二次構造—キャップ構造、ポリA尾部
2. mRNAスキャニング—原核生物と異なり、シャイン・ダルガーノ配列がないため、環状のmRNAを5'側からスキャンし、翻訳開始部位を見つける

Section 19.2: タンパク質合成

■真核生物での翻訳後修飾—ほとんどの新生鎖はいくつかの修飾を受ける

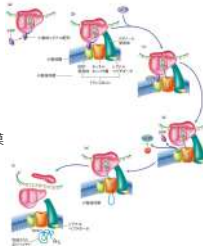


- タンパク質の切断 真核生物で広く見られる
  - N末端メチオニンやシグナルペプチドの除去
- プロタンパク質（不活性な前駆体）を活性体に
- よく研究されている例として、プロインスリンからインスリンへの変換

Section 19.2: タンパク質合成

■小胞体への輸送

- シグナル認識粒子 (Signal Recognition Particle; SRP) がリボソームに結合
- SRPが小胞体上の受容体と結合
- ポリペプチドがチャネル複合体 (トランスロコン) を介して膜に入る
- シグナルペプチドを切断し小胞体内へ分泌

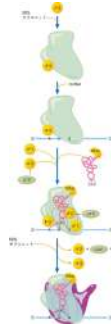


Section 19.2: タンパク質合成

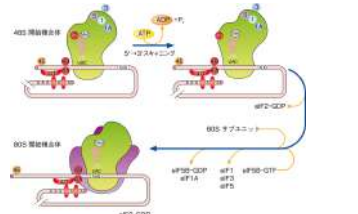
開始—開始複合体の形成

開始因子: IF1, IF2, IF3

- IF3は30S小サブユニットに結合し50S大サブユニットの形成を抑える
- IF1はA部位に結合しtRNAの結合を防ぐ
- 30S小サブユニットはmRNA上のシャイン・ダルガーノ配列 (SD配列; リボソーム結合部位(RBS)) に結合し、すぐ下流のAUGに移る
- GTPが結合したIF2が開始tRNA (N-ホルミルメチオニントRNA) と結合、P部位へ
- GTPの加水分解によって構造変化が起き、50S大サブユニットが結合する

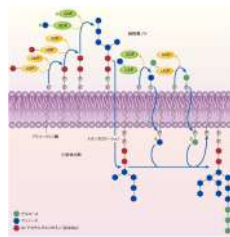


Section 19.2: タンパク質合成



- 多くの開始因子(eIF)関わり、環状のmRNAに小サブユニット複合体が結合した48S開始複合体ができる
- 開始コドンのスキャンし到達すると60S大サブユニットが結合した、80Sリボソームが完成する

Section 19.2: タンパク質合成

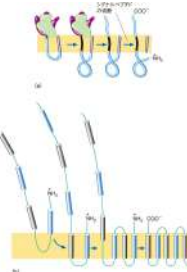


N結合オリゴ糖の合成

- 糖修飾—構造の形成、分子情報の発現
- 多くの分泌タンパク質（細胞の外で働くタンパク質など）は複合型のオリゴ糖を持つ
- 細胞膜上でドリコールリン酸上で組み立てられる

Section 19.2: タンパク質合成

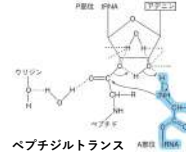
- 膜タンパク質も同様に輸送される
  - 一回膜貫通の膜タンパク質は輸送停止シグナルによって膜通過が停止する
  - 複数膜貫通の膜タンパク質は複数の開始と停止のシグナルを持つ



Section 19.2: タンパク質合成

■伸長—3つの段階からなる伸長サイクル:

- (1) A部位へのアミノアシルtRNAの結合
- (2) ペプチド結合の形成
- (3) トランスローテーション



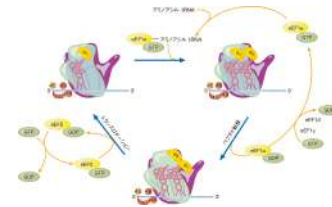
ペプチジルトランスフェラーゼのプロトンシャトル機構

- ペプチド結合の形成は基質内のプロトンシャトル機構
- 反応エネルギーはP部位のtRNAにおけるアミノ酸-tRNA間のエステル結合の切断によって供給

Section 19.2: タンパク質合成

■伸長—いくつかの伸長因子(eEF)が関わる

- 基本的に原核生物と同様のサイクルに進む



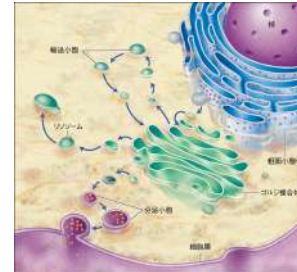
Section 19.2: タンパク質合成

プロリンのヒドロキシ化



- ヒドロキシ化 プロリンとリシンのヒドロキシ化はコラーゲンとエラスチンの構造に必要な
- ヒドロキシ化にはアスコルビン酸 (ビタミンC) が必要、このためビタミンC不足はコラーゲン繊維の強度不全を起こし壊血病になる
- ほかの翻訳後修飾としてリン酸化、脂質の付加、メチル化などもある

Section 19.2: タンパク質合成



Section 19.2: タンパク質合成

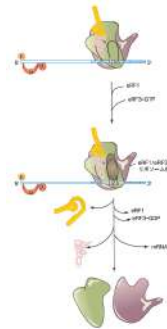
■終結—終始コドン (UAA, UAG, UGA)がA部位に来たときに終結

- 3つの終結因子 (RF1, RF2, RF3)
  - RF1とRF2は tRNAsと形がよく似ていて、終始コドンを認識する。RF3はRF1とRF2をリボソームに結合させるのに必要
  - 完成したポリペプチドをP部位のtRNAから切り離す

- 翻訳後修飾—真核生物では様々な翻訳後修飾が行われるが、原核生物でもいくつかの修飾をうける
  - 最も研究されているのが、タンパク質の分解で、シグナルペプチドやホルミルメチオニンの除去がある

Section 19.2: タンパク質合成

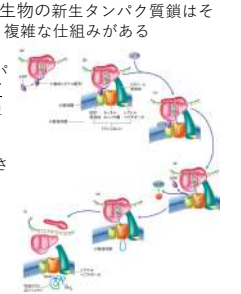
■終結—真核生物では3つの終結因子(eRF)が関わる



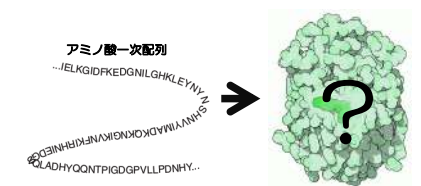
Section 19.2: タンパク質合成

■ターゲティング—真核生物の新生タンパク質鎖はそれが機能する場所に向かう複雑な仕組みがある

- 分泌タンパク質や膜タンパク質は目的地を示す、シグナルペプチドと呼ばれる局在化シグナルを持つ
  - シグナルペプチドによって目的の膜へ挿入される

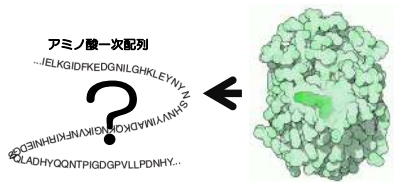


タンパク質のデザイン (設計)  
 アミノ酸配列からどのようにフォールディングして立体構造ができるのかを原理から理解できれば・・・

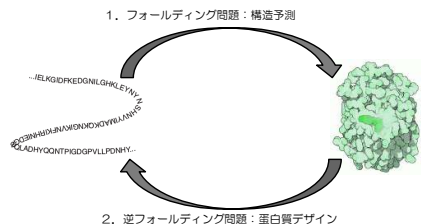




タンパク質のデザイン (設計)  
 ほしい立体構造をもつアミノ酸配列を設計できるよ  
 うになる。(遺伝子は数万円で合成できる)  
**逆フォールディング問題**



フォールディング問題と  
 逆フォールディング問題



フォールディング問題は数の問題

100残基の小型タンパク質がとりうるコンフォメーションの数  
 (Levinthalのパラドクス)

$$3 \times 10^{95}$$

逆フォールディング問題も数の問題

100残基の小型タンパク質がとりうる配列の組み合わせ

$$20^{100} = 1.3 \times 10^{130}$$

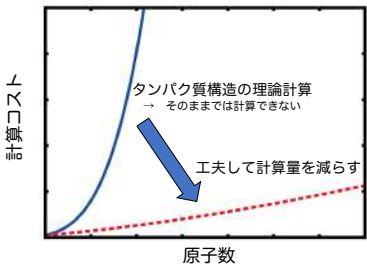
(この数のタンパク質の質量は宇宙の質量よりはるかに重い)

1. フォールディング問題：構造予測



CASP タンパク質立体構造予測コンテスト

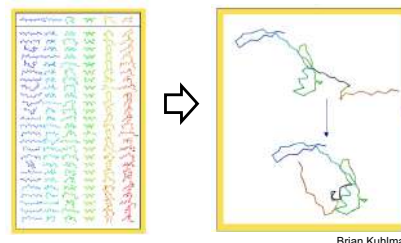
1. 構造生物学者が決定した構造を秘密にしておく。
2. 構造予測研究者が配列から立体構造を予測する。
3. CASP会議にて構造を比べる。



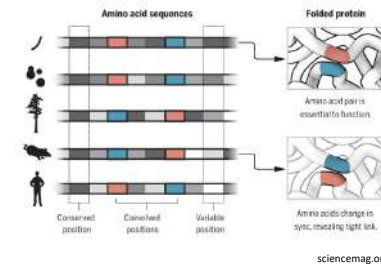
- 易  
 ↓  
 難
- ◎ ホモロジーモデリング
  - ◎ フォールド認識
  - ◎ 新規フォールド

Fragment assembly法 D. Bakerら

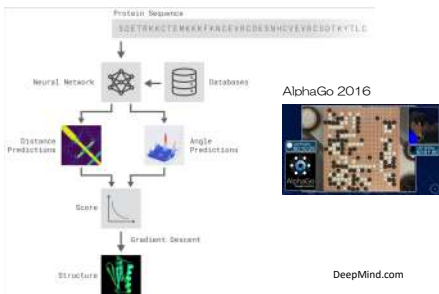
9残基ごとの長さで既知の構造フラグメントライブラリーを作る  
 対象配列に当てはめてエネルギーを評価



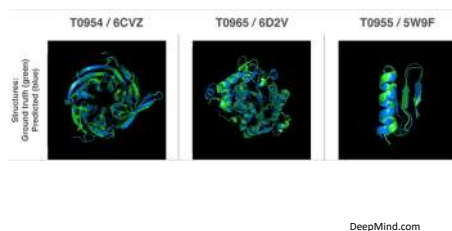
共進化の痕跡から接触残基を予測 Sander, Marksら 2011  
 グenomピックデータから現実的に Bakerらも導入



CASP13 (2018年12月でGoogleが1位に (AlphaFold)  
 これまでの方法を最先端の人工知能 (機械学習) で高度化



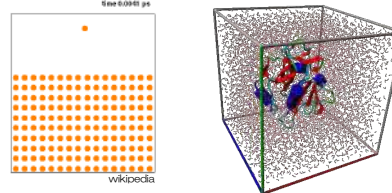
CASP13 (2018年12月でGoogleが1位に (AlphaFold)  
 これまでの方法を最先端の人工知能 (機械学習) で高度化



タンパク質解析への理論的アプローチ

分子動力学計算 (Molecular Dynamics: MD)

ニュートンの運動方程式  
 (力) = (加速度) × (質量)



タンパク質の分子動力学計算の歴史

1977年 BPTI(ウシ腫瘍トリプシン阻害剤: 58残基の  
 分子動力学シミュレーション M. Karplusら, Nature  
 10 psec (ピコ秒)

2010年 BPTIの分子動力学シミュレーション, Nature  
 1 msec (ミリ秒) DE. Shawら

0.000000000001 sec  
 ↓ 33年間で1億倍長い時間の計算が可能に  
 0.001 sec

力場 (force field)

$$V(r^N) = \sum_{\text{bonds}} k_b(l - l_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_a(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \sum_n \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N f_{ij} \left\{ \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{r_{ij}}{r_{ij}^0} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}}{r_{ij}^0} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

タンパク質の分子動力学計算には数十万原子の  
 動きをフェムト秒ごとに計算する  
 → ものすごく速いコンピューターが必要



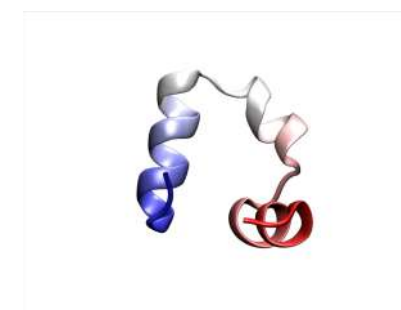
Summit (アメリカ オークリッジ研究所, IBM)  
 2018年現在、世界最速 200ペタフロップス  
 毎秒200京回  
 (かつて世界一だった  
 日本の京コンピューターの200倍)

ANTON (アメリカ 2009)

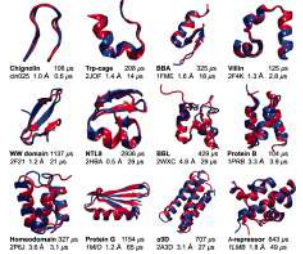
David Shaw 個人が出資・設計  
 タンパク質のMD計算に特化  
 (京コンピューターの100倍速い)



構築費 数十億円 (京より遥かに安い)

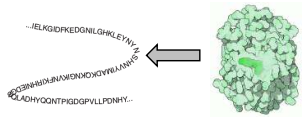


青：実験で決めた形、赤：計算した形



2011年サイエンス誌

2. 逆フォールディング問題：蛋白質デザイン

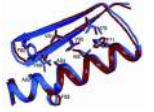


タンパク質デザインの歴史

- 1989年 William DeGrado (UCSF)ら 4本のヘリックスバンドル構造の形成に成功、しかし揺らぎが大きいため構造決定できず
- 1997年 Stephan Mayo (Caltech)ら 計算機による配列探索から特定の構造を持つ配列を決定 ジンクフィンガーモチーフで成功 (NMRで構造を確認)
- 1998年 Peter Kim (MIT)ら ローションジッパーを設計し二、三、四量体のヘリックスバンドルの作製に成功 (X線結晶構造解析で構造を決定 (四量体))
- 2003年 David Baker (ワシントン大)ら 天然に存在しないフォールドを持つ人工蛋白質を設計 Top7 (X線結晶構造解析で構造を決定)

ROSETTADESIGN

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 12;97(19):10383-8. Kuhlman B, Baker D.



- 主鎖構造を維持
- 側鎖に変異導入
- 側鎖のロータマーをモンテカルロ法で生成
- 構造エネルギーを評価
  - (i) the attractive portion of a standard 12-6 Lennard-Jones potential with van der Waals radii
  - (ii) a repulsive term that connects with the 12-6 potential at  $E = 0$  and then ramps linearly up to a value of 10.0 kcal/mol when the two atoms are 0 Å apart
  - (iii) backbone-dependent internal free energies of the rotamers estimated from PDB statistics
  - (iv) the solvation energy computed using the Lazaridis-Karplus implicit solvation model
  - (v) an approximation to electrostatic interactions in proteins
  - (vi) the side-chain-main-chain hydrogen bond term
  - (vii) reference values for each amino acid that are summed to approximate the free energy of the denatured state.

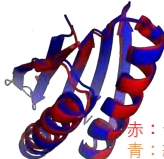
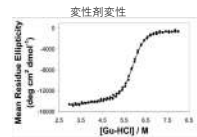
The program is freely available for academic use ([www.rosettacommons.org](http://www.rosettacommons.org))

TOP7

主鎖構造の設計、配列の決定



TOP7



赤：デザイン  
青：結晶構造

wikipedia; Science 2003

タンパク質デザインのバイオテクノロジーへの応用

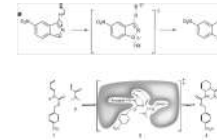
天然の酵素には見つからない反応を触媒する酵素のデザイン  
D. Baker lab. ROSETTA DESIGN

①レトアルドール反応

②ケンプ脱離反応

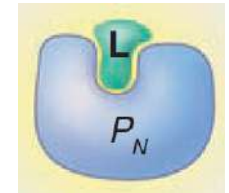


③ディールス・アルダー反応



人工的な酵素の設計方法

基質の遷移状態と立体相補性を持つように設計

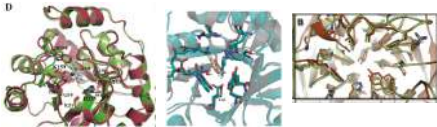


設計方法： 反応の遷移状態と相補的になるように設計

レトアルドール酵素  
Science 2008

ケンプ脱離酵素  
Nature 2008

ディールス・アルドラーゼ  
Science 2010



みんなの力でタンパク質の構造問題を解決する

Folding@home:  
フォールディング計算の分散コンピューティング

Foldit:  
人間の直感力でフォールディング問題を解決

Foldit



Nature 2010

オンラインゲーム： Foldit

ワシントン大学 人間の直感力でフォールディング問題を解決



60

医薬品売り上げランキング

これらは売上高50億ドル規模以上 (10億ドル以上の売り上げを持つ新薬をブロックバスターという)

順位	2000年	2016年
1	ロゼック (抗糖尿病)	ヒュミラ (リウマチ)
2	ゾコーラ (高脂血症)	エンブレル (リウマチ)
3	リビトール (高脂血症)	ハーボニー (C型肝炎)
4	ノルバスク (降圧剤)	レミケード (リウマチ)
5	メパロチン (高脂血症)	リツキシマン (リンパ腫)
6	クラリチン (抗アレルギー)	レプソリド (多発性骨髄腫)
7	タケブロン (抗糖尿病)	アバスタン (大腸癌)
8	プロクリット (腎臓病)	ハーセプチン (乳癌)
9	セレブレックス (抗炎症)	ジェヌビア (糖尿病)
10	プロザ	赤い抗がん剤

医薬品は低分子医薬からバイオ医薬へ

アセチルサリチル酸 (アスピリン、低分子医薬)

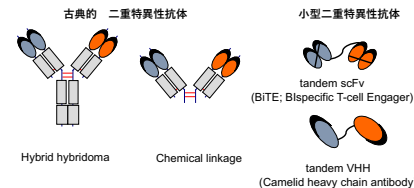
100mg 薬価：5.6円

抗体タンパク質 (バイオ医薬)

100mg 薬価：730,000円 (オプジーゴ)  
(1年の治療で3,500万円)

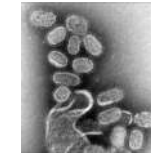
二重特異性抗体

次世代のバイオ医薬品として研究が進められている。

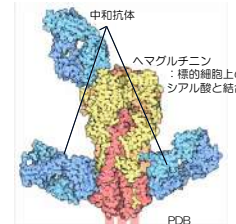


抗インフルエンザ薬のde novo設計

インフルエンザウイルス



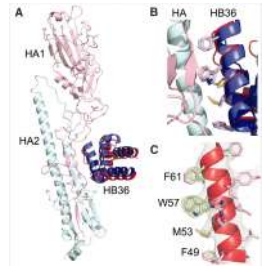
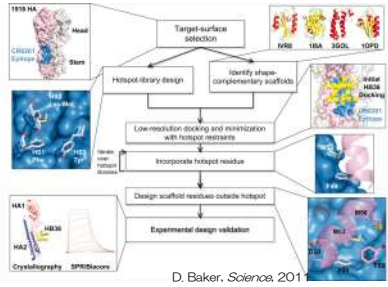
wikipedia



ハマグルチニン：  
細胞上のシアル酸と結合

PDB

# 抗インフルエンザ薬のde novo設計



D. Baker, Science, 2011