

研究終了報告書

「離散的配列ブロックに基づく人工タンパク質配列自在設計技術の開発と応用」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:中野 祥吾

1. 研究のねらい

次世代生物素材の一つとして、タンパク質が注目されている。一方で上記の応用利用を達成するためには、目的に応じて天然由来タンパク質に多点変異を導入しつつ、その機能を改良した人工タンパク質をデザインする必要がある。なぜなら天然由来のタンパク質アミノ酸配列は、それを発現する生物が自らの生存のために進化かつ最適化されており、応用利用に求められる特殊な機能を都合よく併せ持つ事は稀なためである。上記目的を達成するため、タンパク質アミノ酸配列を理解し合理的に改変、目的に応じて機能を変換・制御する技術が必要となる。仮にアミノ酸配列中に機能を規定する文字列(以下離散的配列ブロックと呼ぶ)と、この文字列を組み合わせる規則性を見出し、目的の機能を有する人工タンパク質配列を設計できる手法があれば、上記課題を解決できる。しかし現在までの研究では、このような手法は開発されておらず、機能を自在に制御した人工タンパク質配列の合理的設計は実施できていない。これは平均的な大きさである 300 アミノ酸残基からなるタンパク質の配列の組み合わせは 20^{300} 通りとほぼ無限である上に、タンパク質の種類の違いによって異なる立体構造、すなわち配列の規則性自身が多様であり *ad hoc* な解析が必要である事に起因する。また、アミノ酸の 1 次配列に隠された規則性は、立体構造を生じる過程(フォールディング)、生じた立体構造、立体構造と関連する機能に起因する多次元的な情報が投影されたものであり、人間の目で規則性を見出すことはほぼ不可能である。本研究では、タンパク質アミノ酸配列に隠された機能に関する情報を引き出すためのアルゴリズムを開発し、タンパク質応用利用に資する技術を確認することを目的とする。タンパク質アミノ酸配列中に隠された離散的配列ブロックを同定するアルゴリズムや、コンピュータ内にて目的タンパク質をバリエーション進化させることが可能なアルゴリズム「GAOptimizer 法」を開発する。開発したアルゴリズムを広くタンパク質デザインに適用し、高機能化した人工タンパク質を設計しつつ社会実装を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本提案研究では、離散的配列ブロックに基づく人工タンパク質配列自在設計技術の開発と応用を実現するための、以下 3 つの研究(研究テーマ A から C)を実施した。研究テーマ A では「離散的配列ブロック同定にむけた理論とアルゴリズム開発」を実施した。本研究では数百～数千程度の配列(鋳型配列とそのホモログ配列から構成される)を網羅的に解析して、タンパク質機能をコードする残基コミュニティを抽出するアルゴリズムを開発した。研究テーマ B では「開発した理論に基づく高機能化酵素デザイン」を実施した。研究テーマ A で開発したアルゴリズムを応用してモチーフ候補となる残基を数個選抜、その情報に基づいてホモログ配列を機能ごとにクラスタリングする手法を開発した。本法と祖先型設計法を融合することで、新規な

祖先型 L-アミノ酸酸化酵素群や多数の産業応用酵素をデザインすることに成功した。設計した酵素群を用いて、光学純度の高い D-アミノ酸誘導体の合成やサンプル中の L-アミノ酸濃度定量法を確立することができた。研究テーマ C では「タンパク質インシリコ分子進化法の開発と実験的検証」を実施した。離散的配列ブロックの組み合わせを最適化しつつ目的タンパク質に導入、機能を自在に変化させた人工タンパク質を設計するための方法論を開発した。具体的にはタンパク質分子進化をコンピュータ内にて再現することで配列ブロックの組み合わせ最適化を解決するアルゴリズム「GAOptimizer 法」を開発した。3 つの異なる酵素に本法を適用することで、鋳型となった天然型酵素とくらべてその機能(耐熱性、可溶性発現量、活性 etc)を大幅に向上させた人工酵素群のデザインに成功した。上記結果から、GAOptimizer 法の有用性を実験的に証明することができた。本報告書では既に公表している研究テーマ B および C について記載する。

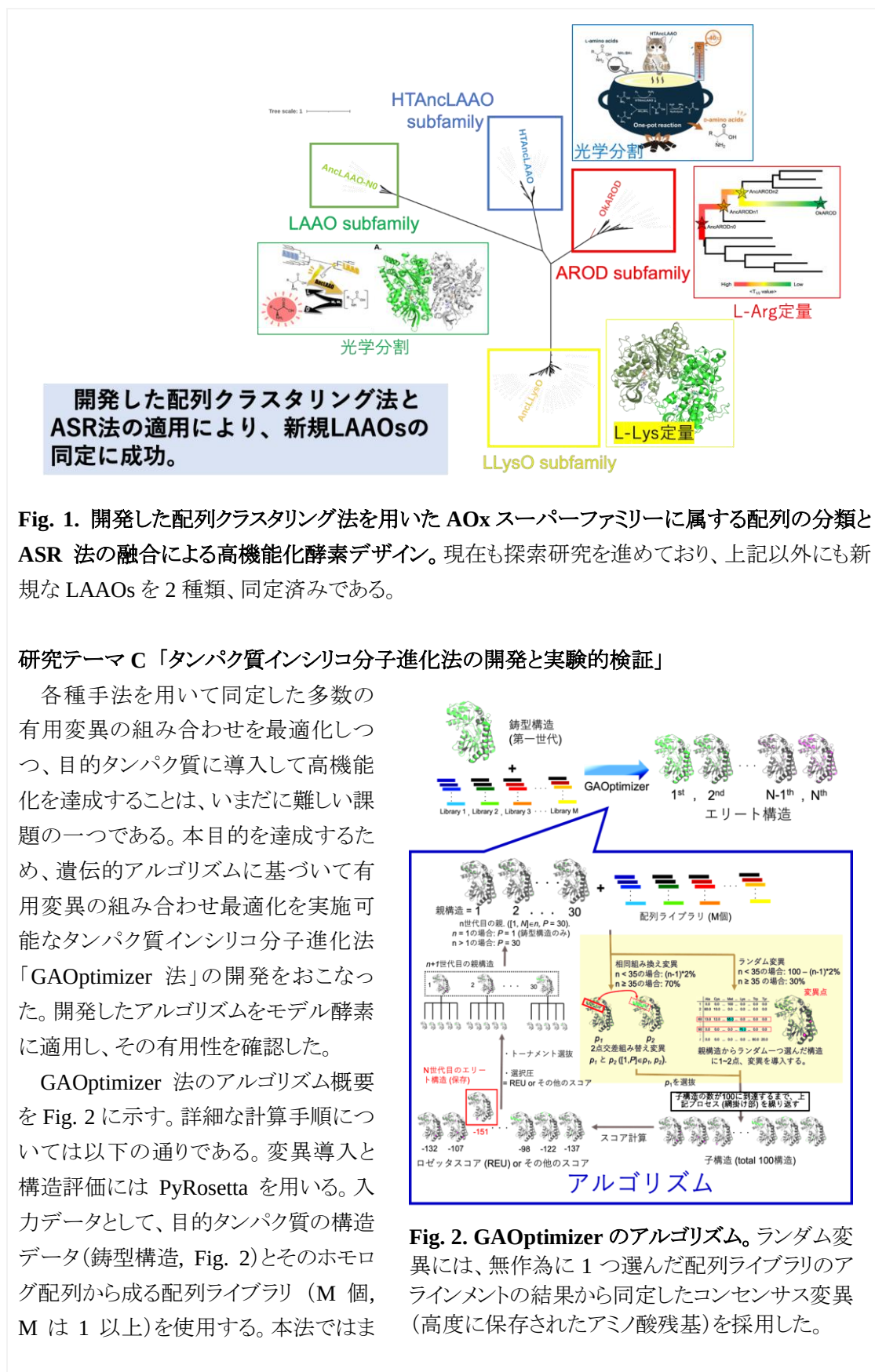
(2) 詳細

研究テーマ B 「開発した理論に基づく高機能化酵素デザイン」

研究テーマ A で開発したアルゴリズムを応用し、データベースに存在する膨大な数のタンパク質アミノ酸配列を機能ごとにクラスタリングする手法を開発した。クラスタリング後の配列は祖先型設計法(ASR)で 1 つにまとめ、その構造機能解析を実施することとした。

開発した配列クラスタリング法の適用先として、アミノ酸酸化酵素スーパーファミリー(AOx)を選択した。AOx は FAD 結合型タンパク質の配列で構成されており、本ファミリー内には多様なアミン類の酸化反応を触媒する酵素が存在している。これまでに 10,000 近い AOx の配列がデータベースに登録されているが、その機能が同定されたものは 3%程度であり、多くの配列は機能未同定のままデータベースに放置されている。提案研究で開発した配列クラスタリング法と ASR 法を融合した手法を用いて、機能未同定の AOx スーパーファミリー内から 4 つの新規 L-アミノ酸酸化酵素(LAAO)の取得に成功した(Fig. 1)。基質特異性の高い LAAO(Fig. 2 中の LLysO および AROD)については、各種サンプル中の L-アミノ酸濃度定量への応用や、新規な L-アミノ酸代謝経路同定につながる研究へと展開されている(成果 5-(1)-1)。広い基質選択性を有する LAAO(Fig. 1 中の HTAncLAAO と LAAO)は化学-酵素法により、分取スケール(100 mg スケール)にて *rac*-及び L-アミノ酸誘導体を D 体へと光学分割できることを報告した(成果 5-(1)-1)。光学分割した D-アミノ酸誘導体の多くは、その鏡像体過剰率(*ee* 値)が 99%を超えており、極めて高い光学純度を有することを確認している。

上記の酵素デザイン以外にも、共同研究を通して数多くの高機能化酵素を開発してきた。研究期間内に耐有機溶媒性の高い祖先型酵素の開発と本酵素を用いたグラムスケールでの L-アミノ酸誘導体合成系の確立に成功した。合成した L-アミノ酸誘導体は本さきがけ領域内の研究者に提供するなど、2 件の共同研究につながっている。また祖先型タンパク質連結酵素「AcSE5」の開発に成功し、本酵素が修飾抗体や固定化酵素の作成に適用できることも報告した(5-(2)-3)。企業との共同研究も進展しており、例えば核酸医薬品合成への応用が期待される祖先型 RNA 連結酵素、AncT4_2 の開発や熱安定性に優れた逆転写酵素の開発(2 件の特許出願, 5-(2)-1)が成果として挙げられる。現在進行中の共同研究も複数存在しており、酵素応用に関する成果創出が期待される。



研究テーマ C 「タンパク質インシリコ分子進化法の開発と実験的検証」

各種手法を用いて同定した多数の有用変異の組み合わせを最適化しつつ、目的タンパク質に導入して高機能化を達成することは、いまだに難しい課題の一つである。本目的を達成するため、遺伝的アルゴリズムに基づいて有用変異の組み合わせ最適化を実施可能なタンパク質インシリコ分子進化法「GAOptimizer 法」の開発をおこなった。開発したアルゴリズムをモデル酵素に適用し、その有用性を確認した。

GAOptimizer 法のアルゴリズム概要を Fig. 2 に示す。詳細な計算手順については以下の通りである。変異導入と構造評価には PyRosetta を用いる。入力データとして、目的タンパク質の構造データ(鋳型構造, Fig. 2)とそのホモログ配列から成る配列ライブラリ (M 個, M は 1 以上)を使用する。本法ではま

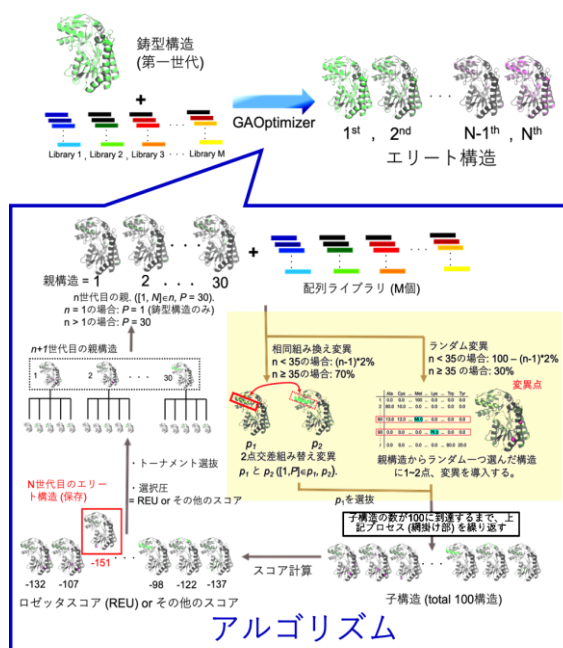


Fig. 2. GAOptimizer のアルゴリズム。ランダム変異には、無作為に 1 つ選んだ配列ライブラリのアラインメントの結果から同定したコンセンサス変異(高度に保存されたアミノ酸残基)を採用した。

ず、30 個の親構造から 100 個の子構造を設計する。子構造は以下 2 パターンの変異導入過程を経て出力される。1 つは、無作為に 1 つ選抜した親構造に 1~2 点のランダム変異を導入することで出力する (Fig. 2)。もう 1 つは、無作為に 2 つ選んだ親構 (p_1, p_2) の部分構造を入れ替える、2 点交叉組み替え変異により発生させる (Fig. 2)。得られた 100 個の子構造についてスコア計算を行う (Fig. 2)。選択圧として機能するスコアには構造安定化エネルギー (REU) を採用した。定義したスコアが最良であった子構造を n 世代目のエリート構造として保存する (Fig. 2)。次世代の親構造はトーナメント選抜によって決定する。復元抽出により 5 つ選抜した子構造の中で、最良のスコアを有していたものを親構造として採用する。これを 30 回繰り返し、次世代 ($n+1$ 世代) の親構造を決定する。上記プロセスを 1 世代分の進化とし、これを N 世代分 (N はユーザーが定義) 繰り返して目的タンパク質の変異組み合わせの最適化を完了する (成果 5-(1)-2)。

GAOptimizer 法の有用性を確かめるため、3 つの異なる酵素群に本法を適用し、その構造機能解析を実施した。結果、デザインした 3 つの人工酵素について、いずれも鑄型となった天然型酵素のものよりもその機能が大幅に向上することが判明した。例えばアルカリホスファターゼの例では、大腸菌発現系で可溶性画分に取得できなかった天然型酵素が、GAOptimizer による設計を通して大量に取得できるようになった。TDH の設計例では耐熱性が鑄型酵素 (CnTDH) と比べて 15 度程度上昇し、S-選択的ヒドロキシニトリルリアーゼの設計例ではその可溶性発現量が 1 桁ほど増大することを確認している。上記の実験結果を基盤としつつ、さきがけ領域内での連携を含め共同研究を開始している。

3. 今後の展開

本提案研究で開発した 2 つのアルゴリズムを基盤とした高機能化タンパク質デザインに関する複数の共同研究を、産学含めて広く展開している。以下の成果リストに記載した以外にも、高機能化した人工タンパク質が現在進行形で創出されており、それらの産業応用を目指した研究が進行している。成果の社会実装は時代の潮流に左右されるものであり、その展開を予測することは難しい。ただ今後 10 年の間に、本提案研究で開発したアルゴリズムを用いてデザインした高機能化タンパク質の幾つかが、ファインケミカル製造プロセスの一部として社会実装されることを期待している。

4. 自己評価

当初の計画では研究テーマ A について、もう少し早期に開発を完了できる予定であった。しかし初期に開発したプログラムにアルゴリズム上の問題があり、大幅な修正が必要となった。開発の遅れはあったものの、最終年度にアルゴリズムの妥当性を実験的に検証することができ、当初の研究目的は達成できたと考えている。また上記アルゴリズムの修正の過程で、リスク回避の観点から導出した理論の応用利用について考える機会がうまれた。このことが研究テーマ A の発展形として、配列クラスタリング法の開発と高機能化酵素デザイン (研究テーマ B) やタンパク質インシリコ分子進化法 (研究テーマ C) の開発につながったと考えている。研究テーマ B と C を基盤とした共同研究が多数実施されており、今後数多くの成果が創出されると期待している。本プロジェクトを通して、共進化情報や立体構造データを利用しつつ、タンパク質アミノ酸配列を変化させて、そ

の機能を自在に制御するための基盤となる技術を構築できたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 23件

1. Yui Kawamura, Chiharu Ishida, Ryo Miyata, Azusa Miyata, Seiichiro Hayashi, Daisuke Fujinami, Sohei Ito, and **Shogo Nakano**, “Structural and functional analysis of hyper-thermostable ancestral L-amino acid oxidase that can convert Trp derivatives to D-forms by chemoenzymatic reaction”, *Communications Chemistry*, 6(1), 200 (2023).

広い基質選択性を有する L-アミノ酸酸化酵素(LAAO)は、D-アミノ酸誘導体の合成への応用が期待されている一方、その大量発現の困難さが問題となっている。本論文では離散的配列ブロック理論と祖先型設計法を組み合わせることで、極めて高い耐熱性と広い基質選択性を有する新規な祖先型 LAAO (HTAncLAAO2)の開発に成功した。本酵素の X 線結晶構造解析を行い、その高い耐熱性が特徴的なオリゴマー構造によってもたらされることを解明した。また活性中心構造を参照しつつデザインした、W220A 変異体は、L-Trp 誘導体に対して高い反応性を有することを確認した。本変異体を用いた化学-酵素法による反応系を用いることで、複数の D-Trp 誘導体を分取スケールで合成することに成功した。

2. Hiroki Ozawa, Ibuki Unno, Ryohei Sekine, Taichi Chisuga, Sohei Ito, and **Shogo Nakano**, “Development of evolutionary algorithm-based protein redesign method”, *Cell Reports Physical Science*, 5, 101758 (2024).

酵素・タンパク質を実験的に進化させ、目的機能を獲得した変異体をデザイン可能な方法として進化分子工学法が挙げられる。本論文では進化分子工学法を模倣しつつ、コンピュータ内にて酵素・タンパク質をバーチャル進化させることが可能なアルゴリズム「GAOptimizer 法」を開発した。本法を異なる 3 つのスーパーファミリーに属する酵素群に適用し、バーチャル進化させることで、鋳型となった天然型酵素の機能(活性、生産性、耐熱性 etc)を凌駕した人工タンパク質をデザイン可能なことを実験的に確かめた。開発した GAOptimizer 法について、Github 上で公開している。

3. Azusa Miyata, Taichi Chisuga, Akira Kambe, Ryo Miyata, Yui Kawamura, Hiroyuki Takeda*, Sohei Ito* and **Shogo Nakano**, “Design of Ancestral Sortase E that is Applicable in Protein Biomaterial Synthesis”, *ACS Catalysis*, 14, 3514-3523 (2024).

ターゲットのタンパク質に、その他の機能性分子を連結することで、多様な機能を付与することができる。酵素を用いた連結法は、タンパク質を選択的に修飾でき、かつ穏やかな条件で反応を行えることから、目的タンパク質の変性を抑えつつ、多様な化学修飾を加えることができる。本論文では独自の配列クラスタリング法と祖先配列再構成法を融合した手法を用いて、タンパク質連結酵素である祖先型ソルターゼ E (AcSE5)の開発に成功した。本酵素を用いて蛍光標識抗体を始めとする修飾抗体や、固定化酵素の作成に成功した。本酵素は従来の酵素よりもさまざまな求核剤を反応できるという特徴を有しており、抗体修飾などに用いられる一部アルキルアミンを直接、アシル供与体と連結できることを実験的に確認できた。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:2 件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	横江 奨、大地 健介、中野 祥吾、伊藤 創平
	発 明 の 名 称	熱安定性に優れた逆転写酵素
	出 願 人	東洋紡株式会社、静岡県立大学法人
	出 願 日	2022-12-14
	出 願 番 号	PCT/JP2022/045987
	概 要	iAnglerNet 法を用いて共進化情報に基づくタンパク質アミノ酸配列分類を実施したのち、祖先型設計法を組み合わせることで熱安定性が向上した人工逆転写酵素に成功した。本出願の酵素はデザインに成功した 2 つの酵素のうちの 1 つ目にあたる。
2	発 明 者	横江 奨、中野 祥吾、伊藤 創平
	発 明 の 名 称	熱安定性に優れた逆転写酵素
	出 願 人	東洋紡株式会社、静岡県立大学法人
	出 願 日	2021-12-17
	出 願 番 号	特願 2021-205526
	概 要	iAnglerNet 法を用いて共進化情報に基づくタンパク質アミノ酸配列分類を実施したのち、祖先型設計法を組み合わせることで熱安定性が向上した人工逆転写酵素に成功した。本出願の酵素はデザインに成功した 2 つの酵素のうちの 2 つ目にあたる。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(国際会議, Invited Speaker)

- a. Shogo Nakano, Design of Ancestral Sortase E that can Apply to Synthesize Protein Materials, the 67th annual meeting of Australian Society for Biochemistry & Molecular Biology, Nov. 15–17, 2023, Canberra, Australia

(国内会議, 招待講演)

- b. 中野 祥吾, アミノ酸配列・タンパク質立体構造データを駆使した高機能化酵素の探索とデザイン, 理論合成インシリコ生物学セミナー(TARA Seminar), 11/25, 2022

(受賞)

- c. 中野 祥吾, 第 22 回酵素応用シンポジウム 研究奨励賞, 一般財団法人 天野エンザイム科学技術振興財団, 6 月, 2021

(プレスリリース)

- d. “たんぱく質をバーチャル進化させて高機能化する手法を開発”, 2024 年 1 月 2 日, <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20240103/index.html>

- e. “たんぱく質を効率的に修飾できる酵素「AcSE5」を開発”, 2024 年 2 月 21 日, <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20240221/index.html>