

研究課題別研究評価

1. 研究課題名： ランダム配列からの機能性蛋白質の創出

2. 研究者名： 四方哲也

3. 研究のねらい：

通常の高分子に比べて、タンパク質はその高い機能性で特徴づけられる。このタンパク質機能の進化のルールを発見するために、ランダムなアミノ酸配列を持つポリペプチドを用いて、試験管内とコンピュータ内で進化実験を行った。

4. 研究結果及び自己評価

研究の方法と結果：

ランダムなアミノ酸配列を持ったポリペプチド(140残基)を遺伝子工学の手法を用いて多種類合成了。すると、約50%ぐらいが大腸菌で発現し、10%が可溶性であった。いくつかの物性を調べてみると、かなり多様性があることがわかった。

ランダムなアミノ酸配列には多様な性質があることがわかったので、その一部(10数アミノ酸残基)を天然タンパク質カタラーゼのC末端に連結するランダム伸張変異を開発した。比較のために、従来のランダム点変異法も同じ酵素に行った。その結果、野生型酵素よりも高機能の変異型カタラーゼが現れる頻度が、開発されたランダム伸張変異法は、ランダム点変異法に比べて、10倍高いことがわかった。このことは、以下のルールで理解できる。天然タンパク質は現在までの進化過程である程度最適化されているので、配列空間上の山の頂上に近いところに存在する。よって、ランダム点突然変異を加えても、多くの変異型タンパク質はその機能が下がる。しかし、ランダム伸張変異ではアミノ酸配列空間に新たな次元を加えることになる。新しく足された次元の空間は進化によって探索されていない処女地なので、野生型酵素は必ずしも頂上には存在しない。よって、野生型酵素より優れた変異型酵素が容易に得られるのである。

天然タンパク質が比較的短い時間に一定の形に折り畳まれるのは、そのアミノ酸配列が特別で、その最安定構造に近づくにしたがってエネルギーが下がる特別なエネルギー局面を持つためである、とされている。果たして、進化の過程でそのような配列が生まれてくるのだろうか。コンピュータの中に初期ポリペプチドとしてランダム配列を用意して、変異と選択を加えた。その結果、基質結合能だけの簡単な選択でタンパク質全体の高次構造が出来上がることがわかった。このことはスプリングモデルなどでも示せるので、高自由度連結系は低自由度の選択によって秩序化する、というルールと言える。

基質結合能だけでタンパク質全体の構造が出来ることがわかったので、ランダム配列(140アミノ酸)のポリペプチドを提示したファージのライブラリーを調製した。そして、エステラーゼ反応の遷移状態アナログ 4-carboxybutyl-phosphonate (CAII) を基質として結合能による選択を行った。その結果、この基質と結合能があるポリペプチドが得られた。そしてさらに、変異と選択を3世代繰り返すことによって、結合能が天然抗体の約半分程度にまで進化した。塩基配列決定の結果より、ランダム配列から数個のアミノ酸置換で結合能をもったタンパク質が進化することがわかった。

自己評価：ランダム配列

100アミノ酸のランダム配列は 20^{100} 種類ある。この中から、非常に少ない種類の機能性タンパク質を選び出すと考えると、この研究は無謀に思える。しかしながら、幾つかの計算より、「進化は比較的創りやすい物を作ってきた」と仮定して研究してきた。そのことが理論的にも実験的にも示せたことは感動である。任意に選んだ配列から、任意に選んだ機能を進化させられたことは、タンパク質進化の問題だけでなく、人工タンパク質創造にも道をつなげたと思う。一方で、選択系の確立にほぼ2年半を費やして

しまい、1)機能を最高まで高めること、2)得られた機能性タンパク質の構造情報を得ること、の時間が無くなってしまった事は残念に思う。

5. 領域総括の見解:

蛋白質のアミノ酸配列の進化については系統的な解析のみが行われ、なぜそのような配列がつけられたのかについては何も触れられなかった。本研究は、一度基質との結合部位ができれば、あとはランダムな配列を加えていくうちに酵素活性が上昇する場合のあることを実証した世界的にみて最初の蛋白質進化の実験的研究である。これからの発展を大いに期待したい。

6. 論文リスト

- 1). Aoki, K., Motojima, F., Taguchi, H., Yomo, T. & Yoshida, M. (2000) The Journal of Biological Chemistry, 275, 13755-13758
- 2). Nakashima, T., Ishiguro, N., Yamaguchi, M., Yamauchi, A., Shima, Y., Nozaki, C., Urabe, I. & Yomo, T. (2000) J.Biosci.Bioeng., 90, In Press.
- 3). Matsuura, T., Miyai, K., Trakulnaleamsai, S., Yomo, T., Shima, Y., Miki, S., Yamamoto, K. & Urabe, I. (1999) Nature Biotechnology, 17, 58-61
- 4). Yomo, T., Saito, S. & Sasai, M. (1999) Nature Structural Biology, 6, 743-6
- 5). Doi, N., Yomo, T., Itaya, M. & Yanagawa, H. (1998) FEBS Lett, 427, 51-4
- 6). Matsuura, T., Yomo, T., Trakulnaleamsai, S., Ohashi, Y., Yamamoto, K. & Urabe, I. (1998) Protein Eng., 11, 789-95
- 7). Yamauchi, A., Yomo, T., Tanaka, F., Prijambada, I.D., Ohhashi, S., Yamamoto, K., Shima, Y., Ogasahara, K., Yutani, K., Kataoka, M. & Urabe, I. (1998) FEBS Lett, 421, 147-51
- 8). Yomo, T., Prijambada, I.D., Yamamoto, K., Shima, Y., Negoro, S. & Urabe, I. (1998) Ann N Y Acad Sci, 864, 131-5