

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名 : プロテインメモリーを利用した低温高機能酵素のデザイン

### 2. 研究者氏名 : 田村 厚夫

ポスドク研究員 森本 さゆり (研究期間 2000 年 10 月 ~ 2003 年 9 月)

ポスドク研究員 笹川 拓明 (研究期間 2001 年 4 月 ~ 2003 年 9 月)

### 3. 研究の狙い :

タンパク質は 20 種類のアミノ酸が特定の配列で結合したヒモ状物質であり、このヒモは自動的に折り畳まれ、特定の立体構造を形成した後、初めて機能する。つまり、配列と構造機能には 1対1の相関がある。そこで、アミノ酸配列を人工設計して、「望みの構造機能を持ったタンパク質を、自由自在にデザインする」ことを最終目標として研究を行った。「望みの構造」として、タンパク質の基本構造単位である二次構造およびナノメートルスケールとなる集合体構造を、「望みの機能」として、タンパク質分解酵素の低温 (0 程度)での高機能化を取り上げた。反応を低温で効率良く行うことは、エネルギーを付加することなく反応が進行するため省エネルギーにつながり、また水溶媒系で副産物を生じないなど環境にもやさしい。

### 4. 研究結果 :

#### (1) 構造デザイン (その 1) : アルファヘリックス

アルファヘリックスというらせん状の構造を 3 本持ったタンパク質を標的として、自然界に存在しない全く新規の配列を用いてこの構造を形成させることに挑戦した。あるアミノ酸配列を与えて、変性して伸びた構造から、目的とする折り畳まれた立体構造に至る道筋に沿ってエネルギー変化を求め、スムーズなエネルギー図形が得られるものを選んだ。実際は実験と理論の両方で試行錯誤することで、望みの構造を安定に形成する新規配列を生み出すことに成功した。(理論計算は共同研究)。

#### (2) 構造デザイン (その 2) : ベータシート

ベータシートという平面状の構造については、まだ理論的計算が困難である。そこで実験的な(構造的および熱力学的)データと経験的直感に基づき形成させることとした。この結果、ベータシートの最少単位である 2 本の鎖からなるベータヘアピンをデザインすることに成功し、得られた構造を核磁気共鳴法で決定した。この結果、構造形成に必要な相互作用が明らかになった。

#### (3) 集合体構造デザイン : ナノファイバー

酵素の類縁体などいくつかのタンパク質について、多数の分子を集合させ、様々な形態と大きさを持ったナノメートルスケールの繊維を形成させることができた。これらは、すべて水溶媒、常温常圧の条件で、分子の自己集合能を生かした最適条件で形成させるものであり、素材自体が天然物であることと合わせ、環境に非常にやさしい集合体である。このナノ構造体の形態を制御する手法を開発し、さらに酵素を結合させる素材として利用した場合、酵素活性の寿命が 2.5 倍延び

ることを示した。

#### (4)低温機能の向上

タンパク質分解酵素サチライシンの遺伝子 (DNA) に故意にランダム変異を加え、得られた多数の変異体の中から低温高活性となったものを選択 (スクリーニング) した。この手法は「進化工学」と呼ばれ、自然進化を試験管内で高速に行うものである。この際、プロテインメモリー現象 (タンパク質自身が、以前どんなタンパク質と結合していたかを記憶 (メモリー) する現象) の利用も図った。得られた約 60 種類の変異体の中で、4 度において野生型 (1.00 のレベル) より高い活性を示したのは約 25%、最も高いもので約 1.6 倍にまで活性が上昇した。自然界に存在する、すでに長年進化してきたタンパク質でも、これだけの高活性化を果たすことができることを示している。

#### 5. 自己評価 :

構造的には、まず、基本的な二次構造単位のデザインに成功したことは、例えば国際的評価の高い学術誌 Structure の表紙を飾るなど、学術的な意義があった。次に、ナノ集合体を形成させ形態を制御し固定化材料としての利用に先鞭をつけた点は、多方面にわたる産業利用も可能であり、特許出願につながった。ナノバイオ分野において、新しい学術および産業分野として発展していくと考える。一方、機能的には、酵素の活性と寿命を併せて 4 倍程度の向上となったが、目標値にあと 2 倍ほど届かなかった。以上より、最終目標 望みの構造機能を持ったタンパク質を自由自在にデザインする」は非常に大きく、3 年間ですべて到達するものではなかったが、明らかに一歩前進したと確信している。将来的には、本研究の成果がまだ断片的であったことから、構造内の組合せ (ヘリックスとシート、二次構造と三次構造、単量体と集合体など)、構造と機能の組合せといったものへ統合発展していくことが必要である。

ポストドク参加型としての評価としては、本研究はバイオからナノ、物理化学に至る非常に広い分野をカバーする必要があったため、それぞれの専門的ポストドクの協力を得られたことが研究の幅広い進展につながった。一方、広く野心的な研究であるため、どこが発展するのかが事前には予測できなかったこともあって、深く突き詰めるべきテーマを選択するのが難しく、研究員によっては十分能力が発揮できなかった感もある。

#### 6. 研究総括の見解 :

本課題は、低温高機能酵素を当面の対象としつつその機能強化を様々のタンパク質改変の手法によって実現しようとするもので、実用的に大きな意味があり採択された。期間の成果は当初の目標値に達しなかったが、数多くの新しい知見を得ており、この分野の発展に有用な成果を上げたと評価される。特に実用の酵素においての数十%の性能向上は大きな意義があり、本人の判断以上の成果と見て良い。新しい知見として進化工学の導入で天然型の酵素でも数十%の性能向上が可能であること、集合体化による構造制御で大幅な性能向上が可能であることを明らかにした点など、今後の実用面での発展につながる知見は、貴重な成果である。

## 7. 主な論文等：

### 原著論文

1. Hiroaki Sasakawa, Sosuke Yoshinaga, Shuichi Kojima & Atsuo Tamura (2002) Structure of POIA1, a homologous protein to the propeptide of subtilisin: Implication for protein foldability and the function as an intramolecular chaperone. *J. Mol. Biol.* 317, 159-167.
2. Tomoko Nakagawa, Hiroataka Shimizu, Karl Link, Akiko Koide, Shohei Koide & Atsuo Tamura (2002) Calorimetric dissection of thermal unfolding of OspA, a predominantly  $\beta$ -sheet protein containing a single-layer  $\beta$ -sheet. *J. Mol. Biol.* 323, 751-762.
3. Masayuki Oda, Atsuo Tamura, Kenji Kanaori, Shuichi Kojima, Kin-ichiro Miura, Keiko Momma, Ben 'ichiro Tonomura & Kazuyuki Akasaka (2002) Functional tolerance of *Streptomyces* subtilisin inhibitor toward conformational and stability changes caused by single-point mutations in the hydrophobic core. *J. Biochem.* 132, 991-995.
4. Wenzhen Jin, Ohki Kambara, Hiroaki Sasakawa, Atsuo Tamura, & Shoji Takada (2003) De novo design of foldable proteins with smooth folding funnel: Automated negative design and experimental verification. *Structure* 11, 581-590.

### 国際会議招待講演

1. Atsuo Tamura, Experimental approaches in designing structured and/or functional proteins. Workshop on Folding, Function and Funnels, January 10-13, Hawaii, USA (2002)
2. Atsuo Tamura, Structural and thermodynamic characterization of designed proteins, KSMB2004 (Keihanna Symposium of Molecular Biophysics), "Physical Aspects of Protein Folding and Function", January 6-8, Kyoto, Japan (2004)

### 国際会議の主催

1. KSMB2004 (Keihanna Symposium of Molecular Biophysics), "Physical Aspects of Protein Folding and Function", January 6-8, Kyoto, Japan (2004)

### 国内学会招待講演

1. 小型タンパク質の理論デザインと実験デザインの接点、国立遺伝学研究所研究会「人工タンパク質のデザインと実験室進化」, 2003年1月15日、三島

### 学会発表

国際 1件

国内 16件

### 出願特許

1. 特願 2003-385670.ペプチドで構成されるナノファイバーとその製法. 2003年11月14日