

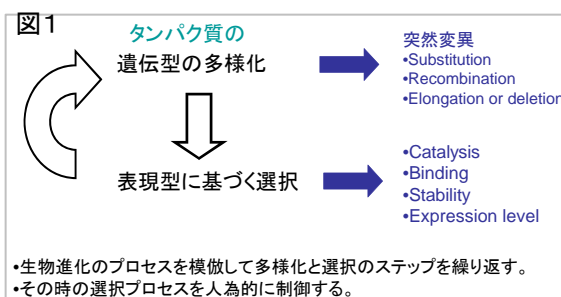
研究課題別評価

1 研究課題名: 分子進化工学的手法による新規トポロジーを有する蛋白質の探索

2 研究者氏名: 松浦 友亮

3 研究のねらい:

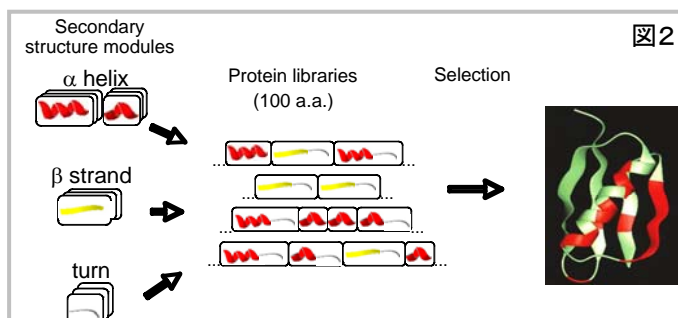
蛋白質は、アミノ酸残基間の相互作用や、溶媒との相互作用など数多くの相互作用により、特有の機能を発現しうる構造に折り畳まれる。一般的に、相互作用が多いほど複雑性が増すため、与えられた摂動に対する影響が予測しにくい。我々は、このような性質を有する蛋白質を理解するための手法として分子進化工学的手法を用いる。分子進化工学的手法とは、多様性を有する蛋白質ライブラリーの作成し、それらの内から目的とする機能を有する分子を選択することを行う(図1)。本研究では、この手法を用いて、新規蛋白質を造り出すことを行った。



4 研究成果:

(1) はじめに

既知の蛋白質は二次構造リッチである。また、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造を構成する配列には、特有の極性と非極性残基のパターンが存在することが知られている(binary パターン)。我々は、現在までに蛋白質が二次構造リッチであることに着目し、二次構造を形成する傾向の強い配列を binary パターンを基にデザイン、合成し、これをランダムに連結することにより、約100アミノ酸残基からなる蛋白質ライブラリー(二次構造モジュールライブラリー)を作成した(図2: Matsuura, T. et al(2002))。本研究では、この蛋白質ライブラリーから分子進化工学的手法を用いて、単一構造に折り畳まれる蛋白質、および機能性蛋白質を選択し、この構造決定を含む構造特性を明らかにすることで、1: 機能性蛋白質が取得できるのか、2: その構造、配列は既知の蛋白質と比較してどのようなものであるのか、という問いに答えることを目的とした。天然に存在する配列、構造は蛋白質物理的に可能な唯一解ではない。よって、新規蛋白質をつくり出し、これを解析することが蛋白質に関する更なる知見を得るのに重要であると考えた。



(2) Bovine Serum Albumin (BSA)結合蛋白質の創出

上記の二次構造モジュールライブラリーからリボソームディスプレイ法という進化分子工学的手法を用いて、機能性蛋白質を取得することを目指した。変異と選択のプロセスを10回繰り返した結果、当初目的としていたピオチンではなくBSAに結合する蛋白質(E8)が取得された(KD = 2.1 μ M)。この蛋白質のBSAとの結合は特異的であり、さらに二次構造を有していることがわかった(図3)。さらに、その2次構造がBSAとの結合に必須であることも明らかにした。また、E8のアミノ酸配列は既知の配列との相同性も無かった。このことは、二次構造モジュールを無作為に連結しただけのライブラリーから機能性蛋白質が造り出せることを示している。さらに、この蛋白質の結晶化を試みたが、構造を決定するに至らなかった。

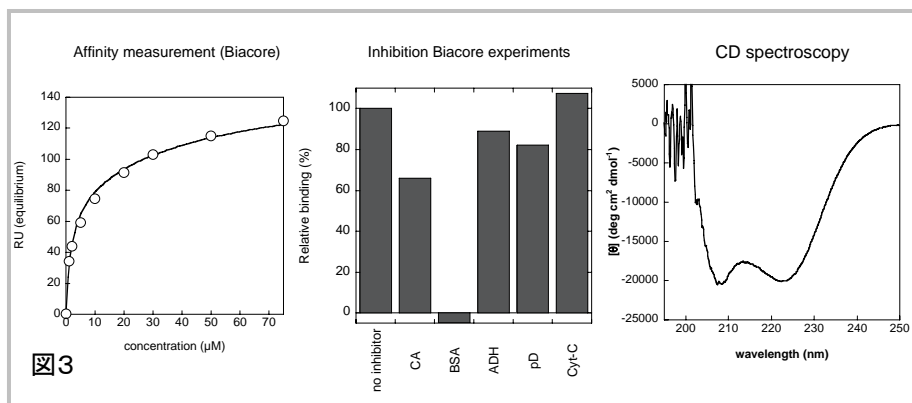


図3

(3) DNA結合蛋白質の創出

天然の蛋白質はその多くが複数のドメインから成るマルチドメイン蛋白質である。様々な蛋白質において、アミノ酸置換を導入したときの機能・構造の変化を調べた研究から、例外はあるものの、多くの蛋白質はアミノ酸置換に寛容であることは広く認識されている。一方で、ドメイン置換が蛋白質の機能に与える影響を調べた例は少ない。

マルチドメイン蛋白質の1つであるDNA結合蛋白質、zif268は3つのドメインから構成されている(図4)。この蛋白質はN末端からそれぞれfinger 1, 2, 3と呼ばれるドメインから構成されており、それぞれのfingerのDNAに対する解離定数はmMのオーダーにあると予測されるが、各fingerが特異的な配列を認識することで全体として 10^{-10} (M)もの非常に高い結合能を示す。このように、各ドメインは低機能であっても、これが集合することにより、全体として高機能を有する。

本研究ではZif268を用い、このドメインを全く異なる配列群に置換して、ドメイン置換がZif268の機能に与える影響を調べた。具体的には、Zif268の3つのドメインのうち、ドメイン1をZif268とは全く関係のない、先に紹介した2次構造モジュールライブラリーで置換したプールを作成した。そのうち無作為に選んだいくつかのクローンのDNA結合能をファージディスプレイ法により評価したところ、そのほとんどがドメイン1を欠失したものに比べて高い機能を有することがわかった。また、挿入されたポリペプチドのアミノ酸配列とDNA結合能とのあいだには、特に傾向が見られなかった。このことからZif268のDNA結合能はドメイン置換に非常に寛容であることがわかった。このことは、ドメイン置換という変異に対してzif268は進化的に寛容であることを示唆している。

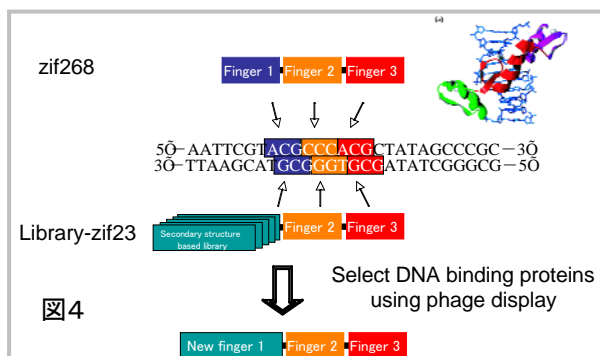


図4

さらに、蛋白質としてどのような機構で異なるドメインを受け入れているのかを理解するため、ファージディスプレイ法を用いてこのドメイン置換ポリペプチドライブラリー(diversity = 105)の中からより高機能なポリペプチドを選択することにした。選択実験を行った結果、アミノ酸配列の異なる数クローンが濃縮され、さらにファージディスプレイ法により、これらのクローンはドメイン1が欠失したzif268よりも約1000倍の結合能を持つことが明らかになった。このように、ドメイン置換により、新規蛋白質が造り出せることを示すことが出来た。

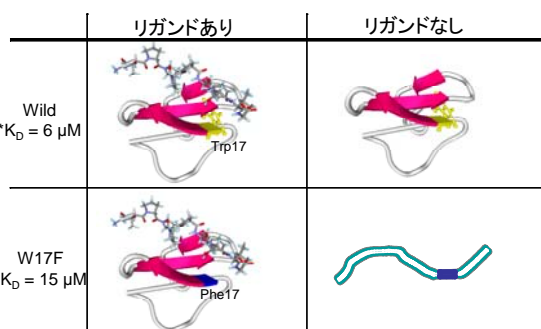
(4) Unstructured protein を初期配列とした機能進化

ほとんどの蛋白質はアミノ酸配列によって規定される特定の高次構造に折り畳まれる。一方、生理的条件下で基質と結合していない状態では特定の高次構造を持たない蛋白質群が近年多数見つかっている。現存の蛋白質は、明らかに進化の産物である。ゆえに、本研究では、特定の

高次構造を持たない蛋白質を出発点として人工的に進化させたときに構造・機能の変化を調べることで蛋白質構造揺らぎと機能との関係性を明らかにする。

特定の高次構造を持たない蛋白質として、hYAP65 WW ドメインの1アミノ酸置換体であるW17F 変異体を用いた。野生型 WWドメイン (WT)はコンパクトな立体構造を有し、PY リガンドと呼ばれるペプチドを基質として特異的に結合する。一方、W17F は基質非存在下では特定の立体構造を持たないが、基質存在下では立体構造を形成し、野生型の 1/3 程

度の結合能を持つことが知られている。我々は、分子進化工学的手法の一つであるリボソームディスプレイ法を用い、W17F を初期配列とした変異体ライブラリーから、PY リガンドに強く結合する分子の選択を行った。また、そのとき W17F の復帰変異が起こらないようにした。その結果、いくつかの結合能の向上した高機能変異体の取得に成功した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより、これら高機能変異体の見かけの分子量は初期配列の W17F よりも小さく(コンパクトに)なっていることがわかった。さらに、結合するという機能を向上させることで、構造特性がどのように変化したのかを調べることにした。また、取得された高機能変異体は基質特異性に関しても変化が見られた。特定の構造を取らない W17F の基質特異性をPYリガンドの変異体を用いて調べた結果、W17F は WT と比べて基質特異性が弱かったのに対して、選択された変異体は基質特性の向上が見られた。よって、あるリガンドに結合するという選択圧を加えた結果、その他リガンドには結合しないという性質が表れうることが明らかになった。



*PYリガンド(EYPPYPPPPYPSG)との解離定数(μM)
Koepf, et al. *Biochemistry* 1999

5 自己評価:

さきがけ研究では、新規機能性蛋白質をつくり出し、これの結晶構造を取得することを目指した。結果的に、現在までに構造を得るまでに至っていないことは反省すべきである。一方で、進化工学的手法を用いて、様々な蛋白質を造り出せたことは満足しており、これからも、進化分子工学的手法を用いて、蛋白質の新たな側面を明らかにしてゆきたいと考えている。ただ、論文にまとめるという作業に予想以上に時間がかかってしまい、研究期間内にまとめることができなかつたことについても反省している。

6 研究総括の見解:

進化工学的手法により新規機能性蛋白質をつくり出そうという試みであり、こういう分野は成果を出すのが難しいことを承知でさきがけ研究者に採択していただいた。狙い通りの成果が出たかどうかは疑問であるが、蛋白質ライブラリーやドメイン置換を用いる進化工学的手法により、新規な蛋白質がつくりだせることを示した点の一つの成果である。ただし未だ構造と機能の関係が明確でないところに留まっているので、今後そのことの意味を突きつめていく方向に研究を進めたい。

7 主な論文等:

論文

1. Matsuura, T., Ernst, A., Zechel, D. and Plückthun A.: (2004). Combinatorial approach to novel proteins. *Chembiochem*, 5, 177-182.
2. Matsuura T and Plückthun A.: (2003). Strategies for selection from protein libraries composed of de novo designed secondary structure modules. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 34: 151-157.
3. Matsuura, T. and Plückthun A.: (2003). Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS letters*, 539: 24-28.