

ランダム配列からの機能性蛋白質の創出

「形とはたらき」領域 四方 哲也

研究のねらい

数百アミノ酸の鎖であるタンパク質が高機能を発揮できるのは、通常の高分子に比べて比較的一定の3次構造に巻くためである。ひとつの遺伝子から出来てきたポリペプチドはほぼ同じ形に折りたたまれるので、特定の化合物などが識別できて触媒機能などを発揮するのである。一方、ランダムなアミノ酸配列を持ったポリペプチドなら特定の構造に留まっている確率が非常に小さいので、1ポリペプチド分子あたりの機能は非常に小さくなってしまう。すると、質問は以下のようになる。「一定の構造と高い機能を示す特別なアミノ酸配列はどのように進化してきたのだろうか。」

この問題にアプローチするためには、2つの方法が考えられる。1つは、現存のタンパク質を比較し分子系統樹を描き、進化時間を逆に遡って進化過程でどのような変化が起こったかを推定する方法である。もうひとつは、実験室でタンパク質を進化させて、その形や働きの創出の原理を求める方法である。この研究では、後者の方法論に基づき、試験管の中やコンピュータの中でいくつかの進化実験を行い、タンパク質進化のルールを発見することを目的とした。

研究の方法と結果

1. 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した。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（図1、図2）。
2. 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（図3）。このことは、アミノ酸配列空間上の地形を考えると理解できる。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きているので、配列空間上の山の頂上に近いところに存在する。

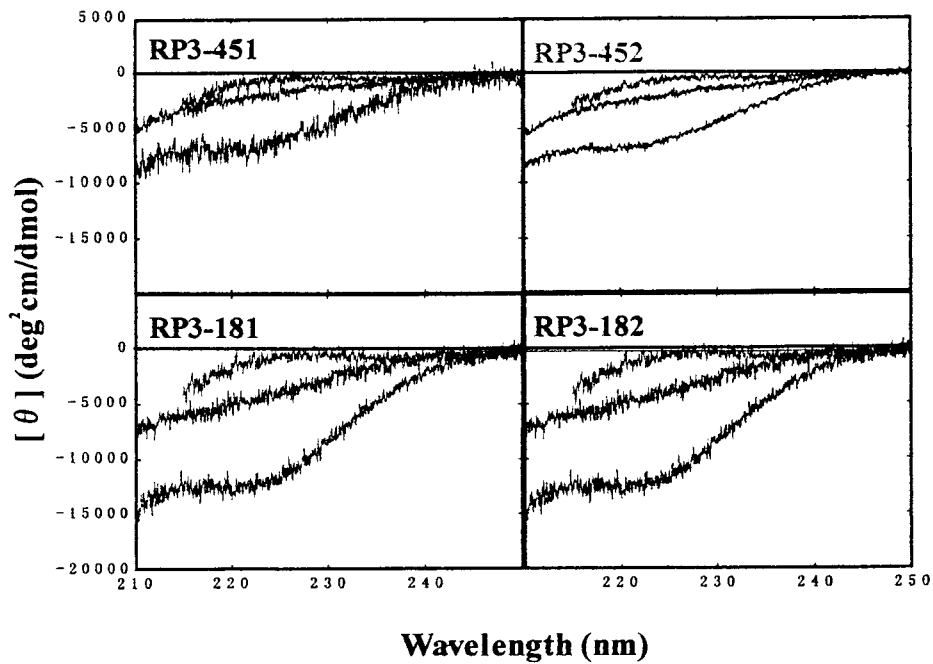


図1 PH6でのCDスペクトル
 4種のランダムポリペプチドで、緩衝液（青）、8 M 尿素（赤）、50% TFE（緑）の条件で想定した。尿素変性状態に比べて PH6 の状態では、上段 2つの配列ではヘリックスはほとんど無いが、下段 2つの配列は少しヘリックスを示している。

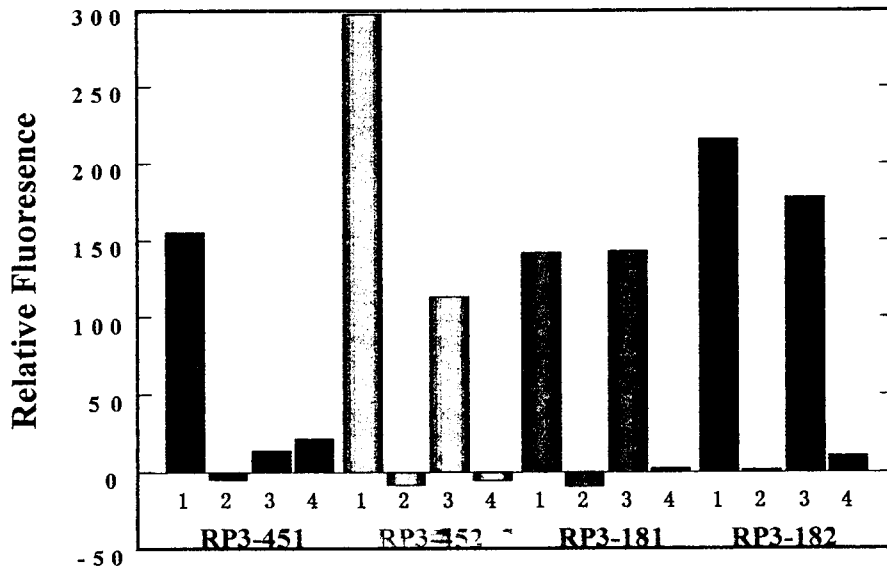


図2 ANS への結合能
 疎水性環境になると蛍光を示す ANS に対する結合を図 1 に示した同じ 4 種のポリペプチドで調べた。PH3 緩衝液 (1)、PH3、8 M 尿素 (2)、PH6 緩衝液 (3)、PH6、8 M 尿素 (4) の 4 条件で測定した。尿素変性状態では蛍光が小さいことから、疎水性コアが出来ていることがわかる。

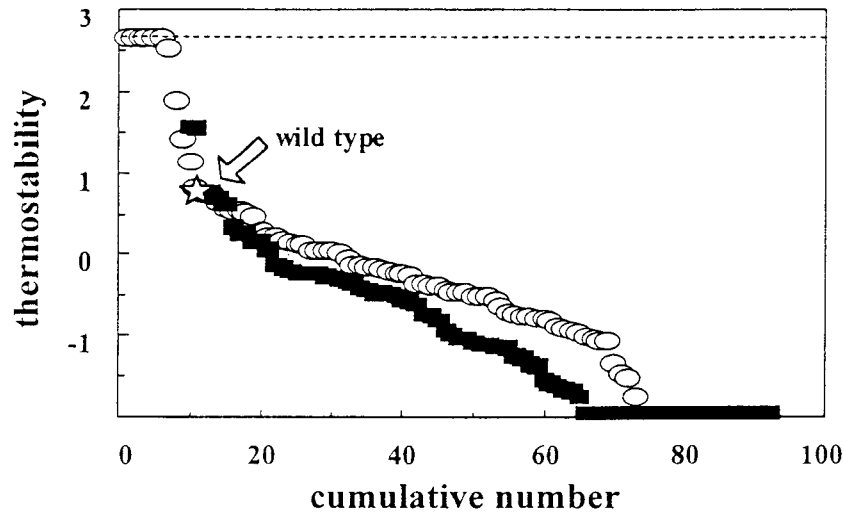


図3 ランダム伸張変異法とランダム点変異法によって現れる変異型カタラーゼ
 それぞれの変異法後、選択なしに変異型カタラーゼを部分精製しその機能を測定した。ここでは、熱安定性を $-\Delta G^\ddagger/kT$ の相対値で示した。☆は天然のカタラーゼの熱安定性、○はランダム伸張変異法、■はランダム点変異法、それぞれで現れた変異型酵素を安定性の高い順に並べた。

よって、ランダム点突然変異を加えても、多く変異型タンパク質はその機能が下がることになる。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(図4)。タンパク質進化はアミノ酸配列空間内の運動と捉えられる。点変異によって登り詰めた局所的な山を伸張変異は尾根に変えて進化しつづける方法のひとつである。

3. タンパク質の中のペプチド結合には回転の自由度が残っている。それゆえ、タンパク質は様々な形を作り出せるのである。それは、逆に一定の形に留まっているこ

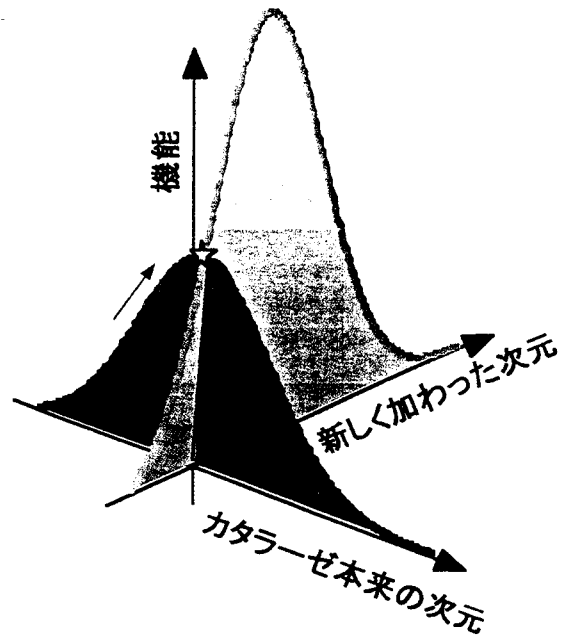


図4 アミノ酸配列空間上の地形
 点突然変異は天然進化でも実験進化でもカタラーゼ本来のアミノ酸残基数で決まる次元を持った空間上の山登り運動(赤矢印)となる。山の頂上にまで上り詰めた後ではすべての変異型酵素は機能が下がってしまう。ランダム伸張変異はアミノ酸残基数を増すので新しい次元が加わる。するとカタラーゼ本来の配列空間上で山の頂上であったとしても新しい空間から見れば尾根となっていて、機能の高い変異体が現れやすい。

とを難しくする。たとえば、各回転角度に3通りがあったとすると、100アミノ酸からなるポリペプチドには3の100乗程度の形が存在し、 10^{-12} 秒に1つの構造をランダムに探索したとしても、最小エネルギー構造に行き着くには100億年を超えてしまう。これは、100アミノ酸が互いに相互作用しあって、多体問題になるからである。この問題を考えると、天然タンパク質が 10^{-3} 秒程度で一定の構造に巻くことは奇跡的であり、レビンサールのパラドックスと言われている。このパラドックスの答えは、天然タンパク質のアミノ酸配列は特別で、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。つまり、もともとあった多体問題を進化過程で解決した

配列だけが生き残っている、というのである。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、以下の1)から4)のプロセスを一世代とする進化実験を行った。1) 初期配列にアミノ酸置換をいれて変異型配列を用意する。2) 経験ポテンシャルを使って、2つの配列をそれぞれ10回ずつ折りたたむ。3) 末端に決めた基質結合部位のアミノ酸が特定の配向になっている頻度を計算する。4) その頻度が高い配列を次の世代の初期配列として1)に戻す。

generation=10



generation=100



generation=200

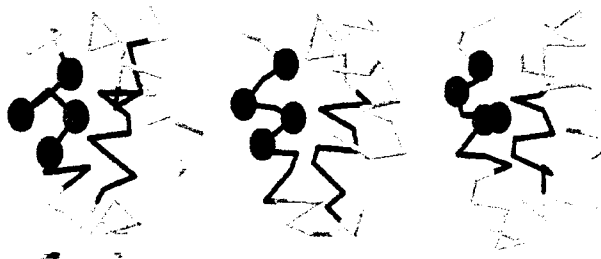


図5 コンピュータ内の人工進化

ボールは基質結合部位としたアミノ酸残基。赤色はヘリックス。各世代で選ばれた配列を10回折れたたみシュミレーションした結果の3つ最終構造を載せた。世代を重ねるごとに、基質結合部位以外の領域が選択をかけていないにもかかわらず、一定の形になるように進化している。

その結果、10世代目で選ばれた配列では、10回の折りたたみシミュレーションで異なる構造が現れていたが、世代が進み200世代での配列では、選択をかけた基質結合部位だけでなく、他の部分もほぼ同じ形に収束していくことがわかった。また、タンパク質に見られるヘリックス成長も観察された(図5)。以上のことより、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(図6)。このことはスピングラス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、と言うルールと言える。

4. 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(図7)。その結果、たった3世代でもかなりの結合能の増加が観測された(図8)。

今後の展望

図8を見ると2世代目で最大の結合能を示した配列は3世代目ではほぼ真中に位置している。このことは、CAIIに対する結合能の進化はまだまだ頭打ちからは遠く、世代を重ねればますます結合能の増加が見られると推定される。よって、この進化実験を数世代続け、図中に示した天然抗体に匹敵する程度の結合能を持つ配列を得る。その後、高次構造、エステラーゼ活性等を調べる。

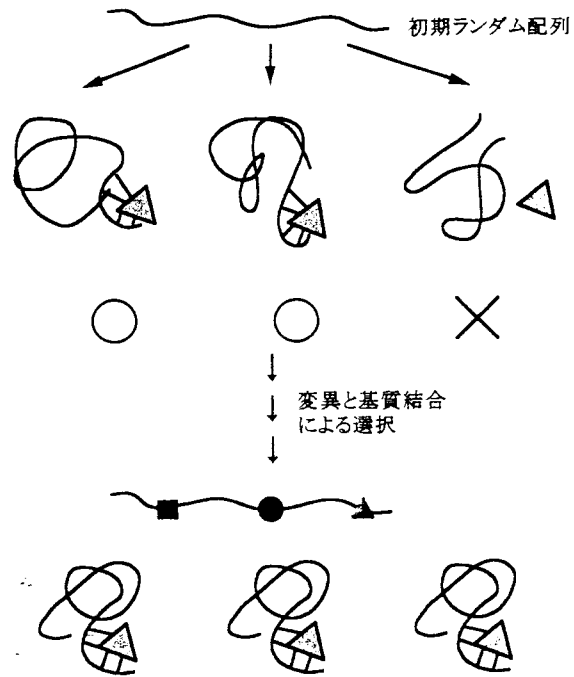


図6 基質結合による局所的な選択で全体の構造が創出する

△で表した基質に結合する頻度が高い配列を選択する。その際、他の部分はどのような構造でも良いとする。それでも、変異と選択を繰り返せば、容易に1つの構造に折りたたむ配列が進化する。

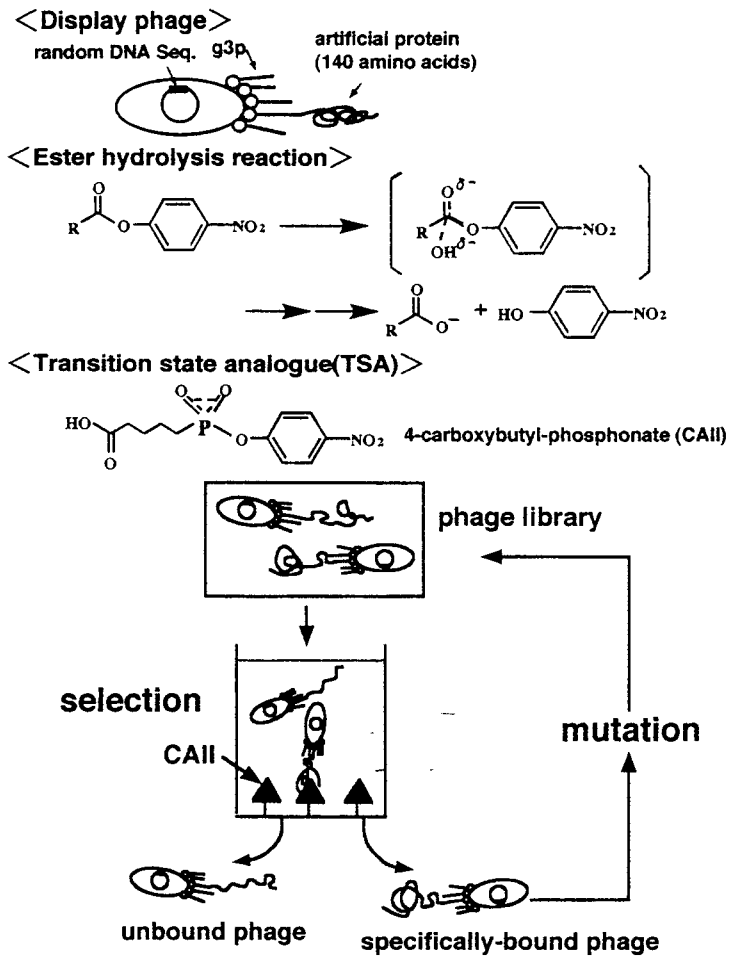


図7 フェージディスプレイ法によるランダムポリペプチドの選択法
プレートに化学結合させた CAII に結合するランダムポリペプチドを提示したフェージだけを選択し、その DNA に変異をかけて再びライブラリーを作り次世代の選択を行う。

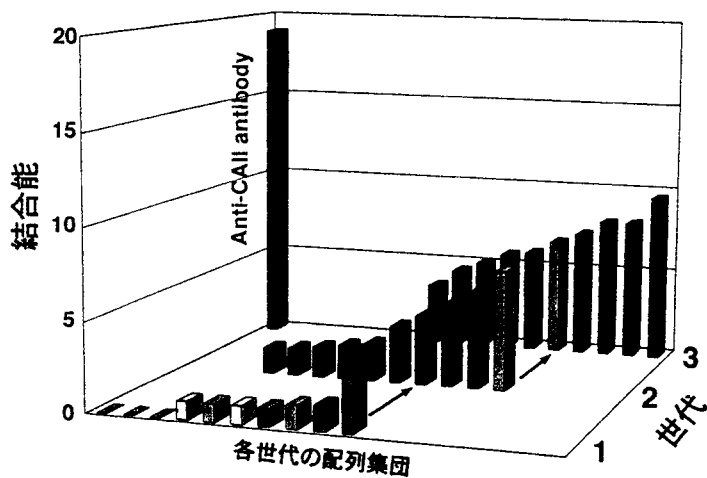


図8 ランダム配列からの CAII への結合能の進化
正のコントロールとして用意した anti-CAII antibody にはまだ及ばないが、たった3世代で CAII に対する結合能はかなり向上した。

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., Ohashi, 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

国際学会招待講演

Third European Symposium of the Protein society

外部発表 28件 (論文 (英文) 8、解説 1、口頭 19 (招待講演 6) : 国内会議17、国際会議 2)