

サブテーマ名：A 高速分子進化のための基盤技術の開発

小テーマ名：A2 配列空間適応歩行技術の展開

フェーズ I <1-c>, <1-b>の一部

## [概要]

進化分子工学におけるダーウィン進化とは、配列空間における適応度（例えばアプタマーの場合、結合反応の $\Delta G$ ）の山を登ることである。これにより巨大な配列空間（134bpのDNAの配列の種類は $10^{80}$ で、これは宇宙の全原子数に相当する）を全数調査しなくて済む可能性がでてくる。山の地形の統計的性質がわかっていると盲目の登山者でも合理的な山登りができる。これを適応歩行技術という。具体的には逐次の淘汰に対する逐次の突然変異体ライブラリーを地形の性質に合わせて作製するのである。次の2つの分子の進化を例題として、適応歩行技術を改良する。

(1) ペディオシン（抗菌ペプチド）の抗菌スペクトルの改変： 配列空間適応歩行技術を利用して、ペディオシンの進化工学実験を行い、抗菌活性が上昇した改良体の取得を目指す。

(2) アルデヒド還元酵素の耐熱化： DNAシャフリング法の発展型である偏向変異集積（BMA）法をアルデヒド還元酵素の耐熱化に適用する。BMA法一般のための1次ライブラリー作成法の改良を行う。また、実験室内分子進化の理論を発展させる。

## [フェーズIの研究成果]:

### (1) ペディオシン（抗菌ペプチド）の抗菌スペクトルの改変

埼玉県は、首都圏内に位置しており、首都圏に集中した人口の消費を賄うために、加工食品・日配食品などの食品製造企業が密集しているという特徴がある。このような食品の製造現場では、近年、製造過程に混入する乳酸菌による製品の酸敗防止が大きな課題になっている。この酸敗防止の一つの解決手段として、乳酸菌の増殖を抑制する物質の一種である抗菌ペプチドとよばれる分子の利用に注目が集まっている。抗菌ペプチドは、保有生物自身が生産しているため、保有生物自体への作用は極めて小さいことが知られている。また、小さな分子でできていることから生体内で容易に消化され、アミノ酸として吸収されるものと考えられている。そのため、食品添加物として利用しても安全性が極めて高い抗菌性物質といえる。このような有用な抗菌性ペプチドの一種に細菌 *Pediococcus acidilactici* が生産する **Pediocin**（ペディオシン）がある。ペディオシンは食中毒菌であるリステリア菌に対し高い抗菌活性を示し、また同時に乳酸菌にもその効果を発揮する。しかしながら、ペディオシンは、酸敗の原因菌として分離された細菌 *Leuconostoc lactis* YK株に対しては効果を示さないという欠点もあった。そこで、本グループ実験班では、天然型ペディオシンに進化工学的な手法を適用して改良することにより、*L. lactis* YK株に対しても抗菌活性を示すような、より強力な改変型ペディオシン分子の開発を目指した。

フェーズ I では、1 アミノ酸置換型ペディオシンのライブラリーの作製と有用変異体のスクリーニングを目標とした。まず、天然型ペディオシンのアミノ酸配列全領域を対象として、その1アミノ酸を他のアミノ酸に置換したライブラリーを一部にランダムな配列を有するプライマーを用いたPCRにより作製した。そのライブラリーを構成する約1200個の分子について、プレートを用いた評価法によって、*L. lactis* YK株に対する抗菌活性を測定した。その結果、もとの野生型ペディオシンよりも高い抗菌活性を示す6種類の1アミノ酸置換型ペディオシンを得ることに成功した。

### (2) アルデヒド還元酵素の耐熱化と偏向変異集積法の改良

アルデヒド還元酵素の立体構造データ（PDB）に基づき全ての1アミノ酸置換体に関する耐熱性スコアを計算した。ここで、ポテンシャル関数として、太田の経験的ポテンシャルを適用した。このポテンシャルは、①アミノ酸側鎖間の2体相互作用エネルギー  $E_1$ 、②アミノ酸側鎖と主鎖の相互作用エネルギー  $E_2$ 、③アミノ酸側鎖の水和エネルギー  $E_3$ 、④2次構造に関するエネルギー

ギー  $E_4$  のそれぞれの項を、PDBの蛋白質立体構造データから抽出したもので、エネルギー関数  $E$  はこれら4種類のエネルギーの和となる。

アルデヒド還元酵素は全部で324個のアミノ酸残基から成っており、それらの全ての1アミノ酸置換体は全部で  $324 \times 19 = 6156$  種類だけ存在する。これら全ての変異体の耐熱性を評価する基準として、

$$Z = \frac{|E - \langle E \rangle|}{SD[E]} \quad (1)$$

を用いた。ここで、 $E$  は、あるアミノ酸配列をアルデヒド還元酵素の立体構造に乗せたときのエネルギーであり、 $\langle E \rangle$  と  $SD[E]$  はそれぞれ、同じ配列を他の構造アンサンブルに乗せて計算したエネルギー分布の平均と標準偏差である。ZはZスコアと呼ばれるもので、エネルギー  $E$  の統計的有意性を示す。Zが天然配列のZ値よりも大きなアミノ酸置換を「耐熱性アミノ酸置換」と見なし、耐熱性アミノ酸置換が多い部位を全部で20カ所選んだ。

この20カ所の部位の全てにおいて、NNKコドンを用いた部位特異的変異導入を行い、1アミノ酸置換体各種の耐熱性を評価した。ここで、耐熱性の定義は

$$\text{耐熱性} = \frac{60^\circ\text{Cで1時間処理後の常温での酵素活性}}{4^\circ\text{Cで1時間処理後の常温での酵素活性}} \quad (2)$$

とした。酵素活性は、補酵素であるNADPHがNADPに変換された時の蛍光の消光の強弱で評価した。結果、調べた20カ所中で9カ所の部位で少なくとも1つの「耐熱化アミノ酸」が見いだされた。図1に、耐熱化アミノ酸をもつ9種類の変異体の特性を示した。横軸は「変異体の相対活性 = 変異体の常温における活性 / 野生型の常温における活性」、縦軸は「耐熱性」である。図から、常温での活性と耐熱性には負の相関が見られる。耐熱化の度合いが高い変異体は野生型に比べて約5倍程度耐熱化したことになる。ただし、活性は野生型の活性の4割に低下した。

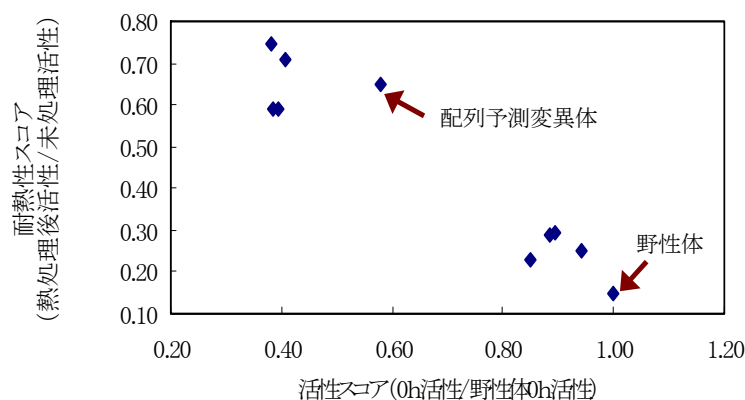


図1 アミノ酸置換体9種類と野生株、及び設計された多重変異体の活性と耐熱性のプロット

## [フェーズIIの研究成果] :

### (1) ペディオシン (抗菌ペプチド) の抗菌スペクトルの改変

フェーズIIでは、フェーズIで得られた6種類の1アミノ酸置換型ペディオシンをさらに組み合わせて、2置換体・3置換体・4置換体の交配型ペディオシンを作製し、より高い抗菌活性を有するペディオシンの取得を目指した。その結果、2アミノ酸置換体の1つで、もとの野生型ペディオシンよりも50倍程度高い活性を示すものが得られた(図2)。この2アミノ酸置換型ペディオシンは、*L. lactis*のYK株以外の株に対しても有効であった。さらに、その2置換体について、様々な*Leuconostoc*属の細菌、*Lactobacillus*属・*Pediococcus*属・*Carnobacterium*属・*Weissella*属の細菌に対しても抗菌活性を示すか検証した。その結果、2アミノ酸置換型ペディオシンは、特定の細菌株に対してはもとの野生型ペディオシンよりもとりわけ高い活性を示すが、別の細菌株に対してはもとの分子よりも低い活性しか示さな

ということが明らかになった。このことは、本改良法により得られた分子が、抗菌スペクトルが収斂され、“特効薬”的な性質を有するようになったことを示唆している。

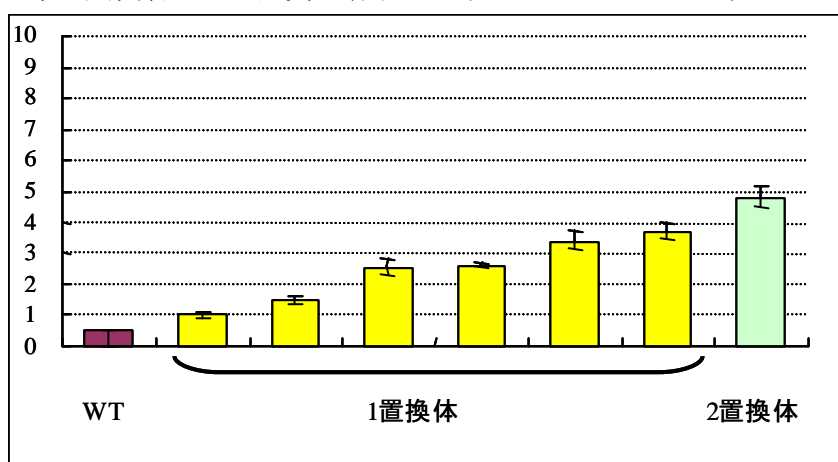


図2 改変体ペディオシンの抗菌活性

被検菌に *L. lactis* YK 株を用いて、プレートを用いた評価法によって抗菌活性を測定した。縦軸は被検菌の生育阻止円直径(mm)。WT:もとの野生型ペディオシン

一方、本研究グループ理論班は、ペディオシンの詳細な立体配座解析を行なうため、二分割したペディオシン PA-1 (44 残基) の二分割構造、つまり N 末端側と C 末端側それぞれ 23 残基 (1 残基がオーバーラップ) のペプチド・フラグメントの初期立体構造を構築し、天然体と、実験班が見出した活性の高かった 1 置換体の 4 種類について、CONFLEX/MMFF94s による配座探索を行なった。得られた配座異性体について、主鎖の  $\phi/\psi$  角 (46 種のねじれ角) を使った配座クラスター解析を行なうことによって、側鎖の配座変化による主鎖の骨格変位に対する影響を解析した。

配座探索を行ったペプチド・フラグメントの配列、探索領域 (Search Limit), および CONFLEX 配座探索で見つかった最安定配座から 10 kcal/mol 以内に存在する配座数を表 1 に示した。現時点で、それぞれの配座探索が十分に尽くされたとは言えないが、それでも、野生型と変異体の立体配座とその分布の違いが局所的な配座構造に及ぼす立体的効果を解析できる。

表 1 Residual sequence, search limit and the number of conformers found by CONFLEX search

Index	Sequence	Search Limit kcal/mol	No. Conf./Cluster
WILD-0123	KYYGNGVTCGKHSCSVDWKGKATT	2.60	5,002/131
WILD-2244	TTCI INNGAMAWATGGHQGNHKC	2.56	1,212/33
MUTE-0123-T08S	KYYGNGV <b>S</b> CGKHSCSVDWKGKATT	2.12	572/75
MUTE-2244-H42R	TTCI INNGAMAWATGGHQGN <b>R</b> KC	2.57	589/49

ここではそれぞれの最安定配座のみを図 4 に示した。これらの構造を比較すると、たった 1 つのアミノ酸残基を変位させただけで、ペプチド骨格の安定配座に与える影響が大きいことが分かる。例えば、WILD-2244 と MUTE-2244-H42R の比較において、野生型 42 His を Arg に変更すると、側鎖は 2 本の結合の分だけ長くなる。一般に、His は弱酸性条件下において 2 つのプロトン供与性水素結合を形成できるが、Arg は 5 つの同様な水素結合が可能である。この例では、42His の  $\gamma$  位の NH 基に対して、42Arg 側鎖の  $\eta$  位の NH 基は結合一本分だけ長くなるだけで、His と同じ 28Asn と水素結合し、それ以外の NH<sub>2</sub> 基はさらに遠い N 末端側の 22Thr や 23Thr の主鎖ペプチド結合のカルボニル基と水素結合している。このことから、Arg 変位は His が形成している水素結合は維持するだけでなく、配列上さらに遠くの、さらに多

くのプロトン受容性の官能基（主鎖や側鎖のカルボニル基）との水素結合を形成し，その結果として，より高い抗菌活性と保ちながら，ペプチド骨格を変位させ，比較的硬いペプチド配座を形成したと言える。

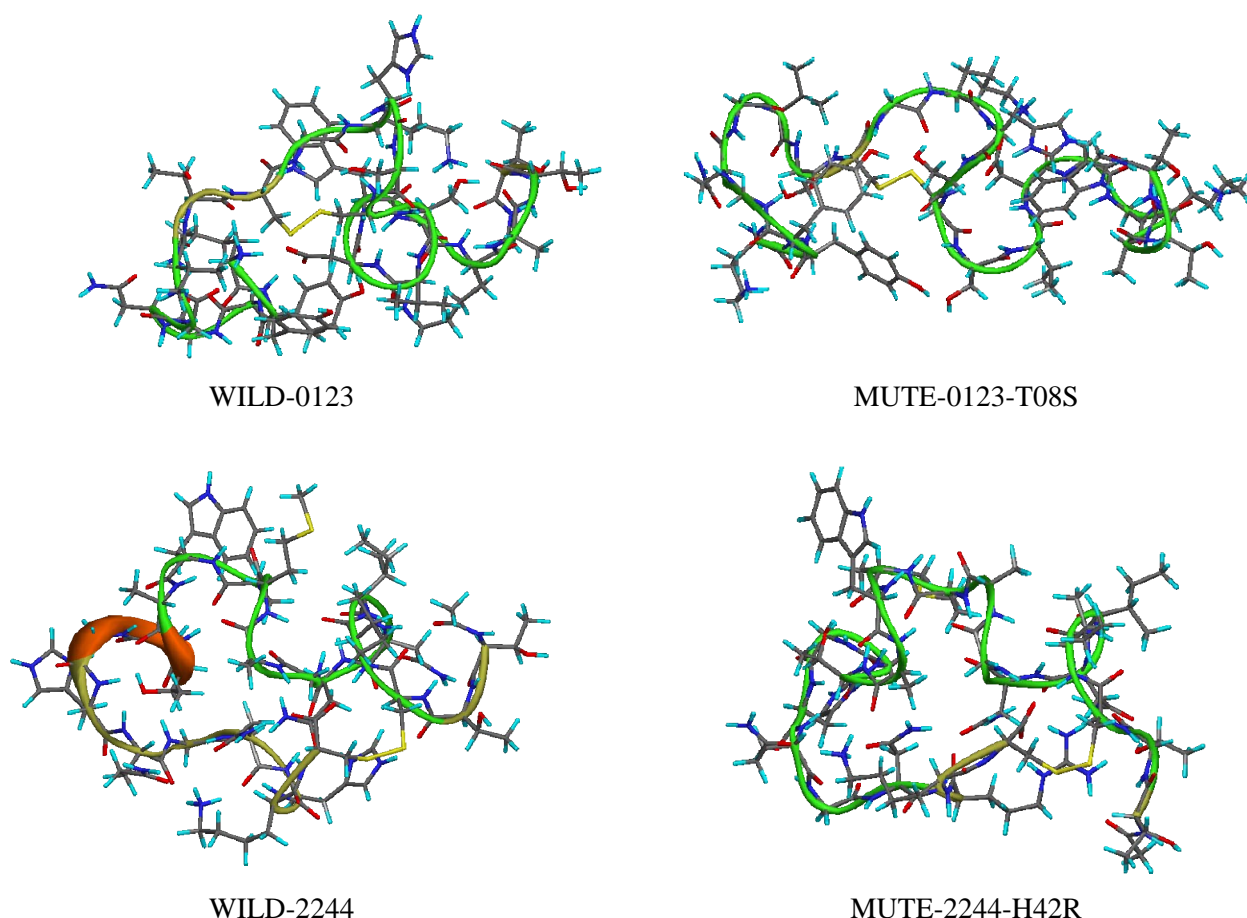


図3 Most stable conformers found by CONFLEX search for the wild and mutated types of fragmented pediocin sequences.

一方，8 Thr を Ser に変位させた時の立体効果も興味深い。β位から一つのメチル基が抜けたことによる立体効果は僅かなように思われるが，実際には非常に大きい。事実，メチル基がなくなることによる立体障害の現象は，S-S結合によって生じた隣接する環状ペプチドの環配座を反転し易していることが，この最安定配座の構造比較から示唆される。

## (2) アルデヒド還元酵素の耐熱化と偏向変異集積法の改良

### ● アルデヒド還元酵素の耐熱化

1 次スクリーニングの結果得られた耐熱性の向上した 1 アミノ酸変異ライブラリー情報に基づいて多重置換体群を作製する。各変異アミノ酸を含み隣接する配列と 15~21 塩基程度オーバーラップするように cDNA を断片化した (図 4)。これらの DNA 断片から、BMA 法のバイアス値 0.8 で、プライマーを用いないオーバーラップ鎖伸長により多重置換体を作製後、cDNA 全体を増幅するためのプライマーを添加し PCR により増幅し多重置換ライブラリーとする。多重置換ライブラリーを発現ベクターに挿入後大腸菌に導入しスクリーニングを行った。

一方で、最も耐熱性が向上すると考えられる変異の組み合わせを理論計算で予測した多重変異体を作製した。その酵素活性評価を行ったところ、耐熱性は野生型の 4 倍強、活性は野生型の 60% 程度であり、期待したほどの加算性が見られなかった (図 1)。

BMA法による多重置換体作製は、1 アミノ酸変異部位が近接範囲に集中しているためプライマ

一添加なしのオーバーラップ鎖伸長の際のアニーリング条件制御が困難を極め、任期内の作製にはいたらなかった。

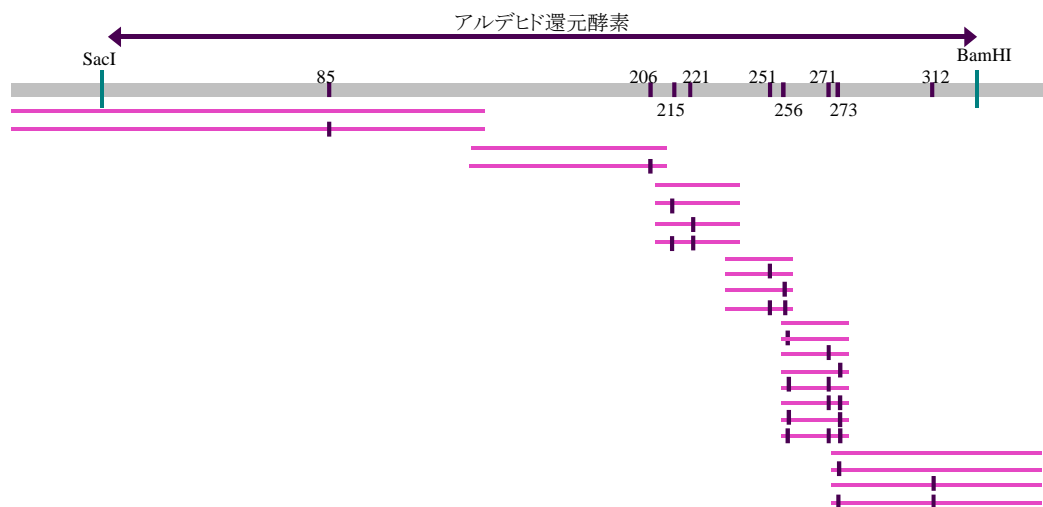


図4 BMA法のためのアルデヒド還元酵素遺伝子の断片化パターン

- 偏向変異集積法の改良（ハミングライブラリー法）

偏向変異集積法においては、如何に効率的に有利アミノ酸置換を見いだすかが重要である。そこで、網羅的に1アミノ酸置換体ライブラリーを作成する方法として、ハミングライブラリー法の開発を試みたが、成果を挙げるまでに至っていない。

- 配列空間内の適応度地形の理論研究

- ① 実在の適応度地形の描像

概要で述べたように、実在の適応度地形の統計的性質を知ることは、進化分子工学の重要課題である。そこで、実在の適応度地形の描像を得るための理論をKauffmanのNKモデルを用いて構築し、それをフェージの感染能の地形に適用した。大阪大学の実験データに当てはめた結果、図5のような地形であることが推察された。

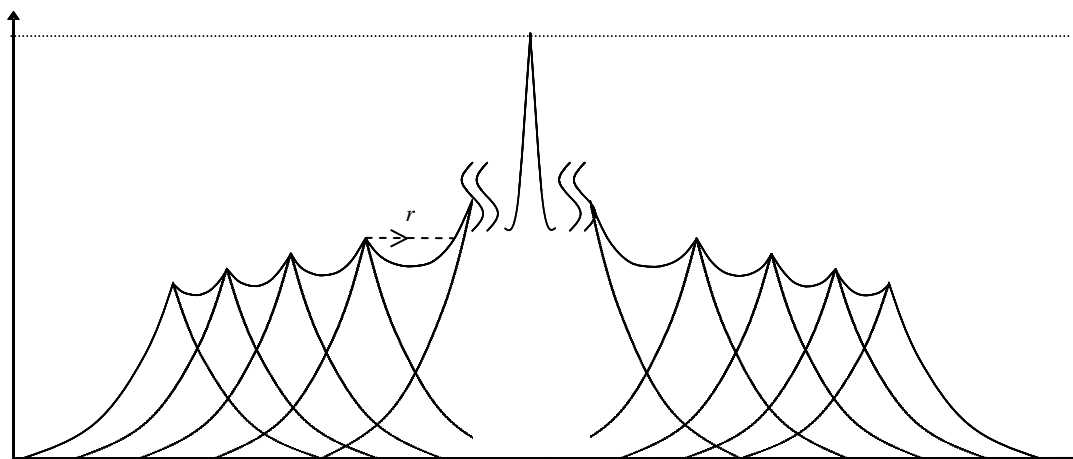


図5 fdフェージの感染能の地形の描像。横軸は配列空間を表し、縦軸は適応度（ここでは感染能）を表す。山麓から中腹まではスムーズなスロープが存在するが、中腹からは局所的最適点が存在する凸凹な地形である。NKモデルのパラメータは $K = 27$ である。

一方で、蛋白質のフォールディング自由エネルギーの地形を理論的に推定したが、この場合は $K = 1 \sim 3$ であり、比較的なだらかな地形であることが分かった。これは、アミノ酸残基の相加性が概ね成立することを意味する。すなわち、蛋白質の耐熱化は、アミノ酸残基の相加性に

基づいた進化工学戦略（例えば、偏向変異集積法（BMA）など）の優越性を理論的に支持したことになる。

## ② 進化過程の熱力学的及び情報論的解釈

蛋白質のフォールディングは（構造空間中の）エネルギー地形上の谷下りとして表現でき、これは熱力学で定量的に記述できる。一方、蛋白質の進化は（配列空間中の）適応度地形上の山登りとして表現できるので、これも“熱力学に似た概念”で定量的に記述できると想像できる。そこで、分子進化のダイナミクス（適応度地形上の適応歩行のダイナミクス）を、熱力学的及び情報論的概念を用いて解釈することを試みた。具体的な適応度地形のモデルとして、(1) アミノ酸残基が適応度  $W$  に加算的に寄与する富士山型モデルと、(2) 残基間の相互作用を採り入れた Kauffman の NK モデルを用いた。これらの地形モデルに関して得られた結果として、「地形定数  $k$ 」、「進化温度  $T$ 」、「自由適応度  $G=W+TS$ 」、「適応度情報量  $W/T$ 」などの新たな量を導入することで、進化ダイナミクスが熱力学の数学的形式と非常によく似た形式で記述できることを、解析的に導いた。特に、「適応度情報量  $W/T$ 」の概念は、DNA 配列もしくはアミノ酸配列の適応度（生物にとっての“価値”）を「シャノンの情報量」と同じ次元で扱った新規な概念である。ダーウィン進化とは、「環境からの情報獲得過程」であることを考えると、生命は環境から「適応度情報量  $\Delta W/T$ 」を吸い上げることで進化すると解釈できる。

## [今後の展開]：

### (1) ペディオシン（抗菌ペプチド）の抗菌スペクトルの改変：

今回得られた改変型ペディオシンは、食品腐敗菌のある特定の株に対しては非常に高い抗菌活性を示したものの、ほかのある株に対しては効果を示さなかった。今後は、効果を示さなかった細菌株を対象として、改変型ペディオシンの取得を目指す必要がある。将来的には、分子進化の結果得られる様々な種類の抗菌ペプチドをミックスして、食品製造現場で使用されることになれば、食品の酸敗が劇的に抑制されるものと期待される。

ペプチド・フラグメントの立体配座解析において、23 残基ペプチドの配座探索はとて多くの計算資源が必要であった。今後も引き続き、この配座探索を継続し、今回得られたペプチド配列と抗菌活性データ、およびその他の計算化学手法を用いた解析データを含めて、広範囲で系統的な活性相関予測のためのアルゴリズムの開発に利用したい。

### (2) アルデヒド還元酵素の耐熱化と偏向変異集積法の改良

常温での酵素活性を保ちつつ耐熱化させることは、別の酵素では、既に BMA 法を用いて行われており、それには、耐熱性を保ちつつ常温での活性を向上させる新たなアミノ酸置換を見いだす必要がある。これらのアミノ酸置換を、本研究で同定したアミノ酸置換と組み合わせることで、野生型の耐熱性を保持しつつ耐熱性が高い変異体を創出できる筈である。プライマー無し PCR が効率的に行われなかった理由として、① DNA 断片の熱力学的特性に大きな差があった、② DNA 断片の精製が不十分であった、などが考えられる。BMA 法をルーチンな手法にするには、プロトコルの精密化が必要である。ハミングライブラリー法の開発はこのルーチン化に寄与するはずである。

蛋白質のフォールディング自由エネルギーの地形の  $K$  の値は 1 ~ 3 であるが、蛋白質の総合的な活性は  $K = 2.7$  など大きな傾向があるらしいことが分かってきた。このギャップは多段階反応モデルで理論的に説明できるかも知れないが、今後の課題となる。適応度地形の描像を多様なタンパク質や核酸について得ることで、適応度地形に関する一般的描像が得られると期待できる。これは、進化分子工学に関する重要な知見であるとともに、生命科学一般に多大なる影響をもたらすだろう。