

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

「変換と制御」領域 田村 厚夫

要 旨

「望みの機能や構造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。「望みの機能」には、自然界を超えた、あるいは自然界とは異なるタンパク質で実現する機能を含んでいる。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」にすることを「デザイン」と称している。

「望みの機能」として、本研究では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が出来れば、有用であるばかりでなく、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ことになる。

具体的には以下の方法を組み合わせて用いることで、この目的に適う酵素のデザインを行った。

- 1) プロテインメモリー現象の利用：タンパク質（プロテイン）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）する現象がある。この現象を利用し、結合していた相手の履歴を辿ることで、合理的に酵素の構造機能を変化させる。
- 2) 試験管内高速進化法（進化学）
- 3) 理論的予測：タンパク質の立体構造形成をシミュレーションする手法を、デザイン研究に適用し、望みの構造、ひいては機能となるようにする。
- 4) 新規固定化法：タンパク質分解酵素は、自分自身がタンパク質であるため、「共食い」を起こす危険がある。これを防ぐためには、酵素を固体につないでしまう（固定化する）と良い。ただし、固体が合成高分子では、環境にやさしいことにならないので、自然に存在するタンパク質分子を集合させ高分子にする手法を開発し利用する。

この結果、酵素の活性、効率、安定性を向上させること、タンパク質の基本構造単位を新しい方法論でデザインすること、タンパク質の集合形態の制御に成功した。今後は、未だ断

片的なこれらの成果を相乗的に組み合わせ、最終目標の「自由自在なデザイン」へ少しでも近付けるよう発展させて行きたい。

1. はじめに

1-1. デザインとは何か

地球上に生命が誕生したのは、38億年以上前のことと言われている。これより、生物は進化し、現在の形となっている。生物は遺伝子（ほとんどの場合DNA）を伝えることで種と自身の情報保存を行い、一方、外的環境の変化に対応するために遺伝子を変化させることで進化してきた。

現在の生命すべてに共通している（セントラルドグマと呼ばれる）のは

DNA → RNA → タンパク質

と表される。つまり、生命は遺伝情報をDNAという形で保存し、RNAを経て、タンパク質を産み出す。通常、DNAは情報を保持するのみで、実際に働く（機能する）のはタンパク質である。そして、進化とは、遺伝子（DNA）の変化であり、遺伝子産物であるタンパク質の変化である。

タンパク質は、自然界に存在する20種類のアミノ酸が多数（数十から数百）結合した“ヒモ”として生体内で合成される。このアミノ酸の配列を「一次配列」と呼ぶ。ある一次配列を持ったヒモが、自動的に三次元的な立体構造を形成（フォールディング（折れたたみ））し、この構造を巧みに利用して機能する。ヒトゲノムプロジェクトも終了が近付き、すべてのDNA配列が解読される現段階に於いて取り組むべき最大の問題は、どのDNA（=アミノ酸）配列が、どのタンパク質構造となり、どの機能を発現するのか、このルールを解明することになる。そこで、現時点での新しいドグマは

アミノ酸配列 → 立体構造 → 機能

となり、この流れを解明することが生命科学で最も重要なことの一つであるというコンセンサスのもとに、自然界に存在する全タンパク質の構造機能の解明をするという国家プロジェクトが全世界で進行している。

では、自然のタンパク質の研究によって、この流れの解明が果たされるのであろうか。実

はこの流れに共通のルール（＝物理化学的な必然性）が存在するのかどうか自体が不明である。つまり、対極的な可能性として、生命は必然ではなく偶然に選ばれた可能性も高い。

現在の生命（タンパク質）がどちらの可能性で決定されたのかを解明する一つのアプローチとして、自然界に存在し得ないものを人工的に創ってみるという手段が考えられる。つまり、タンパク質がある機能を持つためには、どのアミノ酸配列を取るべきかと考える、即ち上のドグマを右から左に逆に辿るものである。ここでは、このような人工的な設計のことを「デザイン」と呼ぶ。もし、実際にデザインができてしまえば、自然物の研究では決して得られない（進化の過程で現在では消滅してしまったものを含む）幅広い標本を提示することとなる。また、そもそも偶然で決まっていればその原理的解明は無意味となるが、実際にデザインする方法論を確定できれば、原理はともかく有用物（例えば、高機能とか高安定性のタンパク質）を創る新規の技術として評価されるであろう。

1-2. デザインの手法

では、実際にどうデザインを行うのか。生命の進化38億年を超えることは可能なのか。アミノ酸数200として、可能な配列の数 20^{200} 乗は、宇宙の星の総数をはるかに超えるとてもない数であるため、すべてをサーチすることは不可能である。それでも、何もしなくては始まらない。そこで、今までの自然界のタンパク質の研究で得た知見を生かし、斬新なアイデアと合わせて、勇気と希望を持っていくつかの方針を設定し、トライしてみることにした。

- 1) 機能：まずは、タンパク質として、身近に有る酵素（タンパク質分解酵素であるサチライシン）を取り上げ、その構造と機能のデザインについてあらゆる手段でアプローチした。手段としては、後述のプロテインメモリー現象の利用、進化工学の適用を行った。機能としては、特に低温での高活性化を目指したが、これは、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ためである。
- 2) 構造：構造的には、タンパク質共通の基本構造単位（二次構造と呼ばれるもの）には、アルファヘリックスとベータシートの2種類があり、サチライシンにも両者が含まれている。タンパク質共通の構造骨格の設計原理を手に入れることにつながる、この2種類の基本単位のデザインを目指した。
- 3) 集合：以上は、タンパク質1分子内の構造機能についての話であったが、研究の過程でタンパク質分子が多数集合して、規則的なナノメートルスケールの繊維形態を取

ることがわかってきた。この集合状態を制御し、ナノスケールでの形態を自在に創り出すことも一つのデザインと考え、その利用を目指した。

1-3. 実験システムの紹介

ープロペプチド-サチライシン系ー

今回、用いる実験系は、微生物（枯草菌）由来プロペプチド-サチライシン系であり、下の図1のようにN末端上流に77アミノ酸残基のプロペプチドがあり、続いて275残基のサチライシン本体となる。サチライシンはタンパク質分解酵素であり、プロペプチドが存在して初めて構造形成するが、その後自らプロペプチドを切断する。つまり、成熟体となったサチライシンは、それ以降構造が壊れても自力では構造形成できない。また、プロペプチドも単独では立体構造を持つことはできない。にもかかわらず、構造のないサチライシンとプロペプチドが共存すると構造形成するという系であり、タンパク質間相互作用と構造形成の解明に適している。なお、プロペプチドは、サチライシンの構造形成を介助するシャペロン作用を持ち、かつ分子内に存在するため、分子内シャペロンとも呼ばれる。

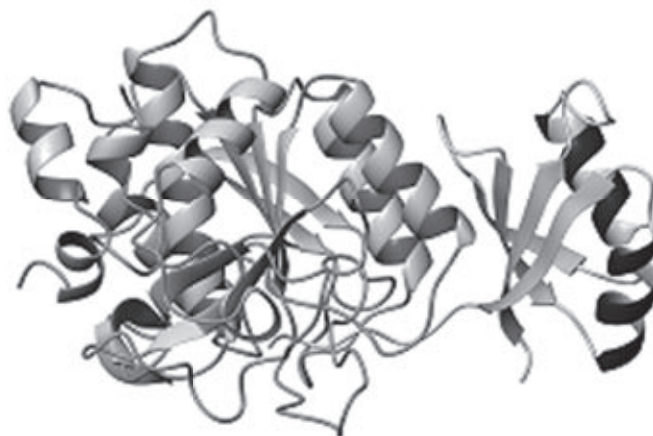


図1 サチライシン（左約3/4）ープロペプチド（右約1/4）の立体構造

ープロテインメモリーー

プロテインメモリー現象とは、プロペプチドにアミノ酸置換を施すと、構造活性が変化し、半永久的に（酵素の寿命まで）記憶されることを指す（U. P. Shinde, J. J. Liu, & M. Inouye, Nature 389, 520-522）。これは、本体の酵素のアミノ酸配列は同一であるにも関わらず、構造

活性が異なる場合があるという大変興味深い現象である。

一般に、タンパク質分子は、他のタンパク質等の分子と相互作用し、構造機能を変化させることで、生体内での機能の制御や情報の伝達を行っている。この相互作用が解除されれば通常は元の構造に戻るが、本研究のタンパク質分解酵素系では、解除後も構造機能の変化が”記憶（メモリー）”され、この記憶はタンパク質の寿命まで保持される。プロテインメモリー現象と呼ばれるこの性質を利用し、相互作用の相手のみを変化させることで、”痕跡を残さず”に標的酵素の高機能化を目指す。

2. 研究内容

2-1. 機能の向上

サチライシンの遺伝子（DNA）に故意に変異を加え、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。変異はerror-prone法を用いてランダムに起こした。

得られた低温高活性酵素の機能の詳細は、酵素化学的に定量的解析（速度定数、結合定数、自由エネルギーなどを求める）で求めた。さらに、なぜ高機能化したのかの原因を解明するために、核時期共鳴法や分光学的手法（CD、蛍光など）による構造解析、構造安定性評価を行った。

得られた結果の一例を後掲の図2に示す。図2で、縦軸は野生型との比で表した相対活性、横軸は得られた変異体を高機能になったものから順に並べたものである。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（M-5と命名）で1.57倍にまで活性が上昇したことが見て取れる。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。逆に、自然のものを、一度に何倍にも高活性化することは困難であることも示唆している。

2-2. 構造デザイン：1）アルファヘリックス

後掲の図3は我々の研究成果が学術誌StructureのVolume 11, Number 5 (May 2003)の表紙を飾ったデザイン原理の概念図であり、これを用いて説明したい。対象としたタンパク質は、アルファヘリックスという、らせん状の構造を3本持ったものであり、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（Denatured構造：図3上方の黄色部分に乗った構造）から、目的とする折り畳まれた立体構造（Native構造：図3最深部の青色部分に示した構造）に至る様々な構造変化の道筋に沿ってエネルギー変化を求め、エネルギー図形（図3の漏斗状のもの）を作成した。エネルギー図形には局所的な極小が見られるが、アミノ酸配列を選ぶとスムーズなエネルギー図形が得られる（図3のレンガで埋めているところ）ことが分かった。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。なお、理論計算は、神戸大学理学部の高田研究室との共同研究である。

2-3. 構造デザイン：2) ベータシート

現段階では、理論的にベータシートを計算してデザインすることは不可能である。このため、実験家の経験と直感に基づき、デザインを行った。直感といってもまぐれではなく、自然界のタンパク質のベータシートはなぜ安定に存在するかの詳細な熱力学的解析結果を基礎に用いている。例えば、静電相互作用、水素結合、芳香族環相互作用の安定化機構とこれらの相対的重要性などの解析結果である。この原理に基づいて、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た。得られた2つの構造を核磁気共鳴法で決定したものを、後掲の図4に示す。ここで、大きな矢印（青緑色）はベータ鎖を、紺色の平面より上に、赤色は下に出ているアミノ酸側鎖を、また多数の細い青線は、距離の近い（0.5 nm以下）原子のペアを示している。アミノ酸が互いに相互作用しながらシート構造を形成していることが見て取れる。

2-4. 集合体デザイン：ナノファイバー

プロペプチド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、ナノメートルスケールの繊維が作成できることを見出した。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。これらが、規則性の高いナノメートルレベルでの構造体を形成すること、その最終形態がバラエティーに富んでいることが、大きな特徴となっている。後掲の図5に2つの例を示す。現在、これらナノ構造体の形態を自在に制御する手法、酵素などを結合させる素材としての利用法を開発中である。

3. 考察（今後の展望）

以上より、現在まで既に達成できたことは

- 1) 機能的には数十パーセント活性の向上した構造体がいくつか得られた。
- 2) 構造的には、基本的な二次構造単位のデザインに成功した。
- 3) ナノ集合体を形成させ、形態を制御することができた。

一方、未達成だったことは

- 1) 機能の大幅な（一桁以上の）向上
- 2) アルファヘリックスとベータシートの共存した構造デザイン
- 3) ナノ構造体の本格的な利用

特に、「機能」を理解するのが最も難しかったというのが正直な感想である。また、機能、構造、集合それぞれについての成果が、まだお互い結びつくまでには至っていない。つまり、最終目標である「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」に到達するまでの道程はまだまだ長い。それでも、新規のアイデアで挑戦し、新しい発見をいくつかすることができたし、今の時点でも次々と新しい事実がわかってきておりワクワクしている。38億年の自然進化を超えることは容易ではなく、世界のほとんどの科学者がなかなか達成できないデザイン研究に於いては、当然失敗の方が成功よりもはるかに多いが、うまくできた時の喜びはそれだけ大きい。今後は、この成果をもとに、新たな知見を集積し、最終目標へ少しでも近づけるよう楽しみながら努力を続けて行きたい。

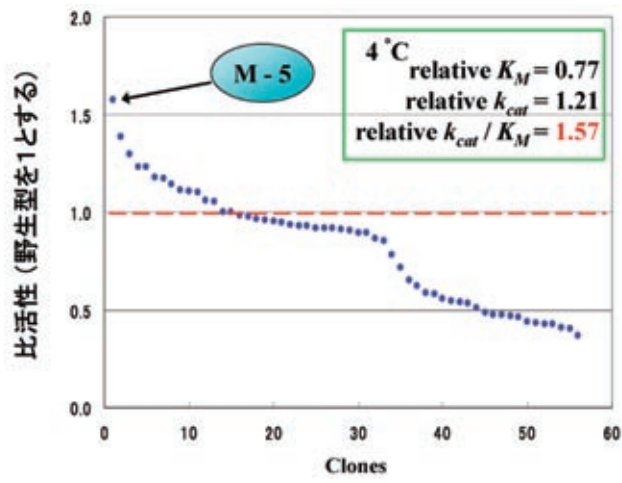


図2

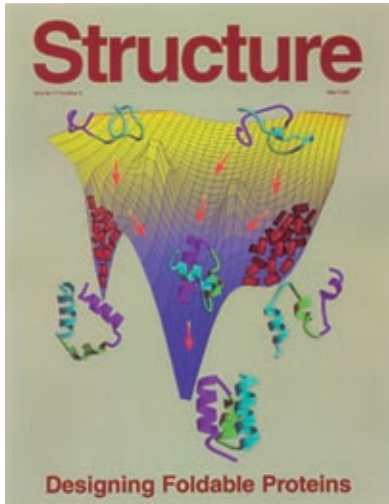


図3

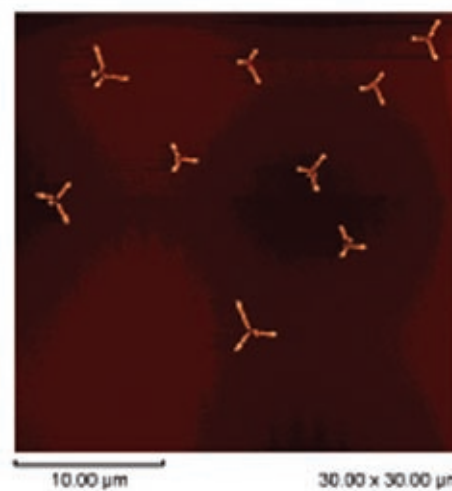
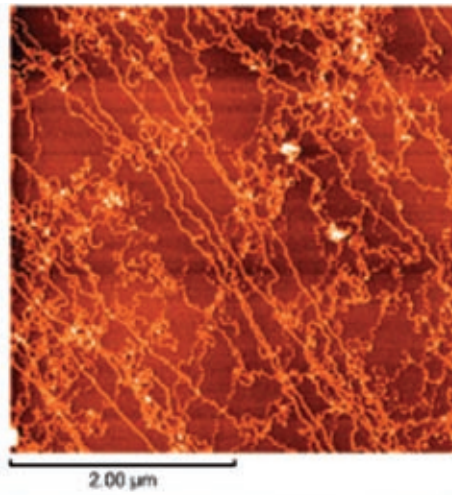


図5

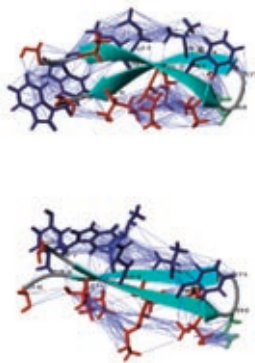


図4

研究業績リスト

出願特許

田村厚夫, ペプチドで構成されるナノファイバーとその製法, 出願中

発表論文

- 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, Hirotaka Shimizu, Karl Link, Akiko Koide, Shohei Koide & Atsuo Tamura (2002) Calorimetric dissection of thermal unfolding of OspA, a predominantly β -sheet protein containing a single-layer β -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)

学会発表

- 1) 田中修平, 武井俊朗, 小島修一, 三浦謹一郎, 田村厚夫, タンパク質 *Pleurotus ostreatus* proteinase A inhibitor 1 のアミロイド線維形成, 第1回日本蛋白質科学会, 大阪, 2001年6月1-3日
- 2) Shuhei Tanaka, Toshiaki Takei, Shuichi Kojima, Kinichiro Miura, & Atsuo Tamura, Formation of amyloid fibrils by *Pleurotus ostreatus* proteinase inhibitor 1, 15th Symposium of the Protein Society, Philadelphia, PA, USA, July 8-Aug. 1 (2001)

- 3) 金 文珍, 神原 大, 田村厚夫, 高田彰二, タンパク質の de novo デザイン -3 helix bundle の場合 - (I) エネルギーランドスケープ理論による配列設計, 第39回日本生物物理学会年会, 大阪, 2001年10月6-8日
- 4) 神原 大, 金 文珍, 高田彰二, 田村厚夫, タンパク質の de novo デザイン -3 helix bundle の場合 - (II) 構造物性の実験的検証, 第39回日本生物物理学会年会, 大阪, 2001年10月6-8日
- 5) 森本さゆり, 田村厚夫, 相同タンパク質間の組合せ変換を利用した自己フォールディング必須部位の同定, 日本蛋白質科学会第2回年会, 名古屋, 2002年6月13-15日
- 6) 荒木 望嗣, 森本さゆり, 田村厚夫, 相同タンパク質間の組み合わせ変換で生じた立体構造の安定化機構, 日本蛋白質科学会第2回年会, 名古屋, 2002年6月13-15日
- 7) 金 文珍, 神原 大, 笹川拓明, 田村厚夫, 高田彰二, タンパク質の de novo デザイン—自動ネガティブデザインと実験的検証—, 日本蛋白質科学会第2回年会, 名古屋, 2002年6月13-15日
- 8) 森本さゆり, 田村厚夫, 活性型 subtilisin 生成過程における propeptide 機能領域の同定, 第40回日本生物物理学会, 名古屋, 2002年11月2-4日
- 9) 田村厚夫, 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」, 三島, 2003年1月15日
- 10) 米原久美子・田中修平・吉野健一・米澤一仁・田村厚夫, 質量分析法によるアミロイド線維形成における構造単位の同定, 第51回質量分析総合討論会, 筑波, 2003年5月14-16日
- 11) 武井俊朗, 小島修一, 田中修平, 田村厚夫, 及川哲夫, 矢崎和盛, 三浦謹一郎, 両親媒性 α -らせん構造形成ポリペプチドの繊維状集合体, 電子顕微鏡学会第59回学術講演会, 札幌, 2003年6月7-9日
- 12) 中川とも子・田村厚夫, β -hairpin ペプチドのデザイン: Single-layer β -sheet を基として, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月23-25日
- 13) 米原久美子, 田中修平, 吉野健一, 米澤一仁, 田村厚夫, 質量分析を用いたアミロイド線維の最終形態を決定付ける中間体のキャラクタリゼーション, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月23-25日
- 14) 居郷哲央, 田中修平, 武井俊郎, 小島修一, 田村厚夫, タンパク質 Yeast proteinase B inhibitor 2 のアミロイド線維形成, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月23-25日
- 15) 森本さゆり, 田村厚夫, 活性型 subtilisin 生成過程で propeptide の構造安定性が及ぼす影響, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月23-25日
- 16) 武井俊朗, 長谷川和也, 難波啓一, 田中修平, 田村厚夫, 及川哲夫, 矢崎和盛, 小島修一, 三浦謹一郎, 両親媒性らせん構造形成ポリペプチド繊維状集合体の X線繊維回折による構造解析, 第3回日本蛋白質科学会年会, 札幌, 2003年6月23-25日
- 17) 笹川拓明・中川とも子・岡本英嗣・田村厚夫, 単層シートを基とした β -sheet 構造を持つペプチドのデザイン, 第41回日本生物物理学会年会, 新潟, 2003年9月23-25日