

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760616

研究課題名（和文） 網羅的変異データベースに基づく新規蛋白質設計法の開発

研究課題名（英文） Development of a new strategy for protein design based on a systematic mutant database

研究代表者

横田 亜紀子（YOKOTA AKIKO）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：20415764

研究成果の概要（和文）：本研究では、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）をモデル蛋白質とし、その網羅的変異データベースを用いることにより、蛋白質の合理的設計に向けた経験則の獲得と、データベースを直接利用した進化工学的蛋白質設計法の開発を通じて、汎用性・確実性の高い新規蛋白質設計法の確立を目指した。網羅的変異データベースの充実化を図ることで、アミノ酸配列と蛋白質特性パラメータとの対応関係など、より精密なデータの収集と新規な知見の獲得が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We have aimed to establish a useful and reliable new method for protein engineering through acquirement of empirical rules towards rational design and development of a scheme based on directed evolution, by using a comprehensive mutant database of dihydrofolate reductase (DHFR) as a model protein. Piecing out and improving the database, we obtained the more precise data about relationship between the amino acid sequence and protein characteristic parameters, which would supply newly desirable information for protein design.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：蛋白質、酵素、機能改変、変異解析

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生命現象の根幹を成す分子機械であり、多種多様な生物機能を担っている。それゆえ、蛋白質の物理化学的基本原理を解

明し、蛋白質を自由自在に設計・制御することは、現代の生命科学における最重要課題の一つである。これまでに様々な蛋白質設計法に関する研究がなされ、進化工学的手法と、

合理的設計法の2つの手法が現在の主流となっているが、膨大な変異ライブラリの作製や、未解決のフォールディング問題の存在など、まだまだ課題も多い。それゆえ、蛋白質を確実に設計するためには、「蛋白質のアミノ酸配列」と「その構造、機能、安定性」の対応関係の調査が必要不可欠であると考えられる。

この対応関係を調査する方法の一つは、アミノ酸配列に摂動（変異）を加えたときの応答を網羅的に調べ、そのデータベースを解析することである。申請者の所属グループでは、以前より、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）をモデル蛋白質として取り上げ、その一アミノ酸置換変異体を系統的に作製し、変異データベースを構築してきた。これは、DHFRの全サイトに19種類の一アミノ酸置換変異を導入し、その個々の変異体の活性、安定性、補酵素特異性などを測定する、という大規模なプロジェクトである。この網羅的変異データベースを多角的に解析することで、アミノ酸配列と蛋白質特性との対応関係が明らかになれば、蛋白質の合理的設計に向けた経験則を獲得できることが期待される。

さらに申請者らは、このデータベースを利用した進化工学的手法として、準加算的適応歩行法（Quasi-additive Adaptive Walking method; QAW法）の開発に着手しており、このQAW法の有効性を示す実験結果も得られているが[Iwakura, M.ら、*J. Biol. Chem.*, **281**, 13234-13246, 2006] [Suemori, A.ら、*J. Biol. Chem.*, **282**, 19969-19978, 2007]、変異部位の選択方法などに関する課題も残されている。

これらの課題を改善し、効率的な蛋白質設計法を確立できれば、蛋白質の医療・産業応用を加速化し、経済的・社会的に大きな波及効果をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）（図1）をモデル蛋白質とし、その網羅的変異データベースを用いて、汎用性・確実性の高い新規蛋白質設計法を確立することを目的とした。はじめに、より精度の高い網羅的変異データベースの完成を目指した。そして、そのデータベースを多角的に解析することにより、アミノ酸配列（変異導入部位や置換するアミノ酸の種類）と蛋白質特性（活性、安定性、基質あるいは補酵素特異性などに対する変異効果）との対応関係に関する経験則の抽出を行い、合理的設計に向けた知見の獲得を目指した。さらに、申請者らが提唱する進化工学的手法として、すなわち準加算的適応歩行法（QAW法）を用いて、DHFRの様々な特性（活性、特異性など）の向上を試みることにより、変異部位の選択方法などに関する課題を克服し、欲しい蛋白質

をより確実に創製出来る手法の確立を目指した。

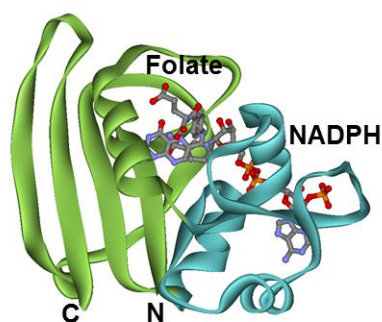


図1 ジヒドロ葉酸還元酵素の立体構造

3. 研究の方法

(1) DHFRの網羅的一アミノ酸置換変異データベースの構築

より確実に高精度な蛋白質設計法の確立のためには、より完成度が高く、より精密な変異データベースが必要となってくる。そこで、データのクオリティが低い、あるいはデータに不備があるサイト（変異体）について、一アミノ酸置換変異体を作製し、各種測定を行なうことにした。すなわち、該当箇所（変異体）について、一アミノ酸置換変異体の発現ベクターを作製し、各変異体について培養・精製を行い、酵素活性、安定性、二次構造、補酵素特異性や基質特異性などを測定し、変異体特性データの収集を目指した。

(2) 網羅的変異データベース解析による合理的設計に向けた経験則の獲得

次に、得られた変異データベースを用いて、アミノ酸配列（変異導入部位や、置換するアミノ酸の種類）と各蛋白質特性パラメータとの対応関係などを調べて、経験則の抽出を目指した。なお、この配列摂動解析を行うにあたり、アミノ酸の種類（アミノ酸特性）のパラメータとして、AAindexデータベース

(<http://www.genome.jp/aaindex>)に集積されている様々な500種類以上のアミノ酸特性データを利用するものとした。

(3) 網羅的データベースを直接利用した進化工学的手法の確立

前述の準加算的適応歩行法（QAW法）を用いて、変異データベースに基づき、「目的特性を持つ1アミノ酸置換変異を選択」→「変異効果の準加算性を仮定して多重変異体を作製」→「多重変異体の発現・精製および特性評価を実施」→「結果をフィードバックし、変異の取捨選択と再評価」という手順で、より高い目的特性を有する蛋白質を創製する。本研究では、目的特性として、高活性化、安定性向上、補酵素特異性変換などに着目した。これらの目的特性を向上させる過程を通じ

て、変異部位の選択方法なども検討していく。

4. 研究成果

(1) DHFR の網羅的一アミノ酸置換変異データベースの構築

これまでに蓄積された変異データベースにおいて、データのクオリティが低い、あるいはデータに不備があるサイト(変異体)について重点的に、一アミノ酸置換変異体を作製・調製し、酵素活性測定、安定性測定、二次構造の測定、補酵素特異性および基質特異性などの各種測定を行ない、変異体特性データを収集した。

(2) 合理的設計のための経験則の抽出

得られた変異データベースを用いて、アミノ酸配列と各蛋白質特性パラメータとの対応関係などを調べた。その結果、野生型が活性や安定性に関して必ずしも最適化されていないことや、活性部位そのものではなく、少し離れた部位への変異により活性が向上することなどが分かってきた。今後は、各蛋白質特性パラメータと構造情報の関係や、変異効果の大きい部位とアミノ酸配列の関係、異なる蛋白質特性パラメータ同士の相関性など、さらに詳細に解析を進め、蛋白質デザインを行う上で有用な知見を獲得していきたいと考えている。

なお、各蛋白質特性パラメータとアミノ酸特性(極性、サイズ等)の関係について調べた結果については、次項(3)に記載した。

(3) 変異データベースと AAindex を用いた配列摂動解析

配列摂動解析は、タンパク質の機能および安定性における、アミノ酸残基の役割を解明する強力なツールである[Takahashi, H.ら, *J. Biochem.* **145**, 751-762, 2009]。網羅的変異体解析の一環として、変異体データベースと AAindex データベース(様々な物理化学的・生化学的性質の観点から 20 種類のアミノ酸を数値化したインデックスを集積した公開データベース)の線形相関を網羅的に調査した。

その配列摂動解析の一例として、DHFR の Thr35 についての解析結果を以下に記載する。

Thr35 は、基質とも補酵素とも直接相互作用を形成していないが、原核生物から真核生物まで DHFR の配列中で保存度が高い残基である。そこで、この Thr35 の高い保存度を支配する要因を解明するために、T35X 変異体を網羅的に作製し、二次構造、活性、安定性などを測定した(図2)。これらの測定結果から、Thr35 への変異導入が、基質結合能および活性の低下と、二次構造の変化に伴う安定性の低下を誘導することが示された。

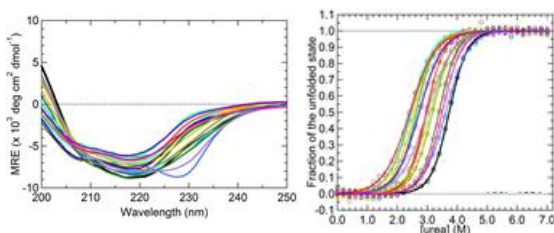


図2 野生型および変異型 DHFR の特性解析データ (左) Far-UV CD スペクトル (右) 変性遷移カーブ

さらに、その収集した変異体特性データとアミノ酸特性の網羅的な相関解析を行ったところ、Thr35X 変異体の基質結合能および活性は、そのアミノ酸の hydrophobicity や極性に影響されることが分かった(図3、図4)。

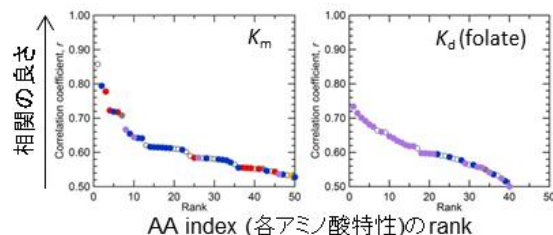


図3 AA index と変異体データセットの相関係数のランキングプロット (左) K_m (右) K_d (folate)

※各プロットは、各 AA index (との相関係数) に相当し、そのクラスターごとに着色; α -helix & turn 偏向性(赤)、 β -sheet 偏向性(橙)、composition(緑)、hydrophobicity(青)、 physicochemical properties(紫)、その他(灰)、未分類(白抜き)

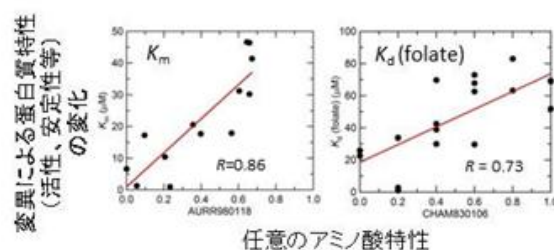


図4 相関性の高いアミノ酸特性と変異効果の組み合わせ (左) K_m (右) K_d (folate)

また、構造情報から、Thr35 は、基質への結合と蛋白質の安定化に重要な残基と相互作用を形成している様子が観察された。

以上の測定データおよび解析結果から、Thr35 は、活性や安定性に対して重要な寄与を行う残基の配向性を調整する役割を担っていること、そしてその役割を果たすために、35 位のサイトには、hydrophobicity や極性を持つアミノ酸が強く求められていること、ゆえに、その要件を満たす Thr 残基の保存度が極めて高い可能性があること、が明らかになった。

このように、変異データベースと AAindex

を組み合わせた配列摂動解析を、他のサイトにも適用することで、各サイトの役割の解明が可能となり、どのようなサイトにどのような性質のアミノ酸を配置すれば良いのか、すなわち、蛋白質の合理的設計の指針となる知見の蓄積が期待できる。

(4) 網羅的データベースを直接利用した進化工学的蛋白質設計法の確立

DHFR は、本来は補酵素として NADPH を用いて触媒活性を行うが、変異導入により、補酵素特性が変わり、NADH を用いたときに活性が高くなる変異体が存在する。そこで、変異データベースに基づき、補酵素特異性に特徴があるサイトを中心に DHFR 変異体の作製を進め、これらの変異を実際に組み合わせ、準加算的適法歩行法 (QAW 法) を用いた DHFR の補酵素特異性変換を試みた。

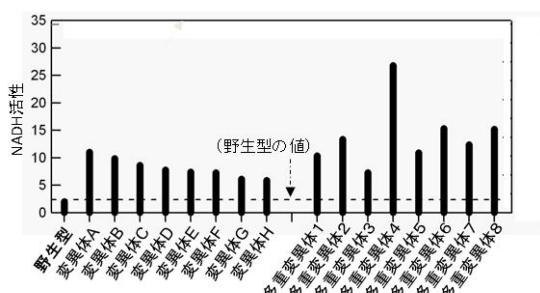


図5 補酵素特異性変換を目的として作製した変異体の活性

その結果が図5である。野生型、NADH 高活性型変異体 A~H、および変異体 A~H の変異を組み合わせることで作製した多重変異体 1~8 の、補酵素として NADH を使用した時の酵素活性を棒グラフで示した。これらの測定結果から、①近接箇所 (特に立体構造的に) の変異は、相加性が成立しないこと、②単変異の活性値の順位は、必ずしも多重変異体の活性値の順位、と一致しないこと (例えば、単変異体の NADH 活性は C>E>F であるが、それぞれに同じ変異 A を導入した多重変異体の NADH 活性は、AE>AF>AC、となり、活性の逆転現象が観察された)、などの知見が得られた。また、③現在のところ、野生型の NADH 活性値に比べて 10 倍以上の NADH 活性を持つ多重変異体の作製に成功した。今後はさらなる多重変異体の作製と活性評価を行うことで、変異部位の選択方法や、変異効果の加算性の適用限界に関する課題を克服し、より効果的で汎用的な蛋白質デザイン方法の確立を目指していきたい。

なお、当初は、活性および安定性に関しても、目的とする特性を改良・向上させた (多重) 変異体を作製し、進化工学的な蛋白質設計法の検証を行う予定であったが、震災により実験に遅れが出てしまったため、それらに

ついては、今後の課題として取り組んでいきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 横田亜紀子、配列摂動解析によるジヒドロ葉酸還元酵素における保存部位の役割の解明、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶應義塾大学 日吉キャンパス、矢上キャンパス (神奈川県)
- ② 横田亜紀子、配列摂動解析：ジヒドロ葉酸還元酵素の保存部位に関する考察、第 11 回 産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2012 年 1 月 31 日、産業技術総合研究所 (茨城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 亜紀子 (YOKOTA AKIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：20415764