

学 位 論 文 題 名

Selection of New Proteins from Random Library Displayed on a Protein Scaffold

（酵素タンパク質表面に提示したランダムライブラリーからの
新規タンパク質のスクリーニングに関する基礎的研究）

学位論文内容の要旨

人類の活動が、これまで人類が生存してきた環境を乱してしまう原因の一つは、その活動系すなわち生産－消費の連鎖の系が、生態系の中で物質的に閉じた循環系を成していないことにある。すなわち、活動の過程で生じた人工物が分解されず、ときに環境汚染物質として蓄積することに一つの問題がある。タンパク質工学により、そのような人工物を分解する酵素を創ることは可能だろうか？ 従来の方法では、既存のタンパク質の部分的改変が主に試みられてきたが、自然界にこれまで存在しなかった基質を認識するためには、おそらく、全く新しい立体構造の「枠組み」もつタンパク質を創り出す必要がある。現在、遺伝子工学により特定のアミノ酸配列をもつ人工タンパク質を創ることは可能である。しかし、タンパク質のアミノ酸配列と立体構造との対応関係が明らかになっていないために、望む機能をもつ酵素を自由にデザインすることは、現在のところ困難である。

一方、生命は、意図的なデザインの方向性をもたずに、環境に対応したランダムな変異と選択の繰り返しの結果、数多くの精巧な酵素を生み出してきた。進化分子工学は、この進化の仕組みを模倣して、非常に大きな遺伝子型のプールから望む表現型をもつ分子を選び出す手法である。しかし、現在、進化分子工学の成功例は RNA とペプチドに限られており、100 残基以上のタンパク質については、全くランダムなライブラリーから構造や機能をもつ新規タンパク質のスクリーニングに成功した例はない。その主な理由は、探索すべきアミノ酸配列空間の膨大さに比べて、現在の選択系の効率が低いことにある。しかし、実際のタンパク質進化の過程においても、全ての配列空間を調べる時間はなかったはずなので、選択効率を上げる工夫がタンパク質進化の仕組みの中に隠されている可能性は高い。したがって、タンパク質の進化分子工学を実現するためには、タンパク質の構造・機能単位であるドメインが、分子進化の過程でどのようにして創られたのかを知ることが重要と考えられる。

本論文では、まず、全く新しいドメイン進化の仮説を提案し、次に、本仮説を実験的に証明し、それを進化分子工学に応用するために必要となる基礎的条件を検討する。

イントロンの発見以来、ドメインはより小さな構造単位の組み合わせで創られたというエキソン混成仮説が提唱されてきたが、最近、この仮説は疑問視されている。それに対して、本論文で提案する仮説では、ランダムで柔軟な構造をもつポリペプチドが、それを支

える「土台」の上で折れ畳み、機能を獲得して、現在の精巧でコンパクトな構造をもつ球状タンパク質に進化したと仮定する。ポリペプチド鎖の両末端が土台に固定されると、ランダム鎖の取り得るコンフォメーションの数は大幅に制限される。そのことがドメイン構築の効率を上げることに寄与すると考えられる。現存するタンパク質ドメインのN末端とC末端が近接する傾向にあるという事実も、本仮説を支持している。

以下の実験では、ランダムな「タンパク質」のライブラリーを「土台」の上に提示することが可能かどうかについて検討した。提唱した仮説においては「土台」として膜タンパク質を考えたが、実験ではモデルタンパク質として水溶性の酵素タンパク質を用いた。その実験上の利点は、提示されたタンパク質の発現を「土台」の酵素活性でモニターできること、および、精製・特徴付けの際の水溶性タンパク質の取り扱い易さにある。これまで、ある酵素タンパク質に外来性のアミノ酸配列を挿入して、その構造・機能に与える影響を調べた例は少ない。特に、挿入する配列の長さに関しては、10 数残基鎖長までしか調べられていない。そこで、本研究では初めて、100残基以上のランダムなアミノ酸配列を酵素タンパク質に挿入し、どの程度の割合の変異体が酵素活性を維持できるかを調べた。

具体的には、土台とする酵素タンパク質として大腸菌 RNase HI を選んだ。RNase HI は DNA/RNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを特異的に分解する酵素であり、その詳細な立体構造が既知で、活性部位や基質結合部位などの情報も豊富にあり、また、*in vivo* および *in vitro* の RNase H 活性測定法が確立していることなどから、本実験に適している。また、挿入するランダム配列としては、20 種類のアミノ酸をすべてコードし、停止コドンを含まないようにデザインされたセミ・ランダムな合成 DNA を用いた。

まず、ランダム配列を挿入する部位を決定するために、2～5 残基の特定のアミノ酸配列を RNase HI の 7 つの部位に挿入して、RNase H 活性が維持され得る部位を検索した。その結果、活性部位に近い 3 つの部位への挿入では活性は失われたが、タンパク質表面に近い 4 つの部位への挿入では活性は維持された。

次に、その 4 つの部位のうち 1 次配列上の中央に位置する His 62 部位を選び、120～130 アミノ酸残基のランダム配列を挿入した変異体ライブラリーを作製した。大腸菌 RNase H 欠損株を用いたスクリーニングの結果、約 10 % のクローンが生育可能なレベルの RNase H 活性を維持していた。挿入変異体を含むクローンの変性・再生ゲルアッセイにより、野生型 (18kDa) より大きい、予想される分子量 (32kDa) の位置に RNase H 活性を示すバンドが確認された。塩基配列を決定した 10 個の挿入変異体タンパク質は、大腸菌内で大量発現すると主に不溶性画分に蓄積した。このうち、よく発現した 5 個の変異体タンパク質を精製した。精製した変異体タンパク質は野生型の 0.2～1 % の比活性を示した。さらに挿入領域にランダム変異を導入することにより、活性が 3 % まで回復し、同時に溶解度の増大した変異体を得られた。変異体タンパク質の CD スペクトルの解析から、挿入されたランダム領域は、特定の二次構造をもたないことが示唆された。また、RNase H 活性の強さと挿入したランダム領域のアミノ酸組成との間には相関があり、ランダム領域のアミノ酸組成が天然球状タンパク質の組成に近い変異体ほど、活性が高い傾向がみられた。

以上の結果から、二次構造を含まない可塑的な構造をもつランダムなタンパク質のライブラリーを、大腸菌 RNase HI の表面に提示できることがわかった。また、それに引き続いてのランダム変異による機能の上昇は、可塑的な構造からアミノ酸置換にともなって構

造形成していくドメイン進化の過程をシミュレートできる可能性を示している。今後、この「土台」上に提示したタンパク質のランダム配列ライブラリーを利用することにより、新しい構造や機能をもつ新規タンパク質の創出に道を開くことができると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一

副 査 教 授 西 則 雄

副 査 柳 川 弘 志

(三菱化学生命科学研究所グループリーダー主任研究員)

学 位 論 文 題 名

Selection of New Proteins from Random Library Displayed on a Protein Scaffold

(酵素タンパク質表面に提示したランダムライブラリーからの
新規タンパク質のスクリーニングに関する基礎的研究)

申請者は、人類の活動がこれまで人類が生存してきた環境を乱してしまう原因の一つは、その活動系すなわち生産－消費の連鎖の系が、生態系の中で物質的に閉じた循環系を成していないことにある、すなわち、活動の過程で生じた人工物が分解されず、ときに環境汚染物質として蓄積することに一つの問題がある、と考えた。そこでタンパク質工学により、そのような人工物を分解する酵素を創ることを思いついた。自然界にこれまで存在しなかった基質を認識するためには、全く新しい立体構造の「枠組み」をもつタンパク質を創り出す必要がある。

進化分子工学は、生命の進化の仕組みを模倣して、進化を伴う非常に大きな遺伝子型のプールから望む表現型をもつ分子を選び出す手法である。しかし、現在、進化分子工学の成功例は RNA と低分子量ペプチドに限られており、100 残基以上の高分子量タンパク質については、全くランダムなライブラリーから構造や機能をもつ新規タンパク質のスクリーニングに成功した例はない。その主な理由は、探索すべきアミノ酸配列空間の膨大さに比べて、現在の選択系の効率が低いことにある。しかし、実際のタンパク質進化の過程においても、全ての配列空間を調べる時間はなかったはずなので、選択効率を上げる工夫がタンパク質進化の仕組みの中に隠されている可能性は高い。したがって、タンパク質の進化分子工学を実現するためには、タンパク質の構造・機能単位であるドメインが、分子進化の過程でどのようにして創られたのかを知ることが重要と考えられている。

本論文では、まず、全く新しいドメイン進化の仮説を提案し、次に、本仮説を実験的に証明し、それを進化分子工学に応用するために必要となる基礎的条件を検討している。

ドメインはより小さな構造単位の組み合わせで創られたというエキソン混成仮説が、

最近疑問視されている。それに対して、本論文で提案する仮説では、ランダムで柔軟な構造をもつポリペプチドが、それを支える「土台」の上で折れ畳み、機能を獲得して、現在の精巧でコンパクトな構造をもつ球状タンパク質に進化したと仮定し、ポリペプチド鎖の両末端が「土台」に固定されると、ランダム鎖の取り得るコンフォメーションの数は限られたものになることに注目し、そのことがドメイン構築の効率を上げることに寄与すると考えた。

まず、ランダムな「タンパク質」のライブラリーを「土台」の上に提示することが可能かどうかについて検討している。モデルタンパク質として水溶性の酵素タンパク質を用いているが、この利点は、提示されたタンパク質の発現を「土台」の酵素活性でモニターできること、および、精製・特徴付けの際の水溶性タンパク質の取り扱い易さにある。これまで、挿入する配列の長さでは、10 数残基鎖長までが限界であった。本研究では初めて、100 残基以上のランダムなアミノ酸配列を酵素タンパク質に挿入し、どの程度の割合の変異体が酵素活性を維持できるかを調べた。

まず、ランダム配列を挿入する部位を決定するために、2～5 残基の特定のアミノ酸配列を RNase HI の 7 つの部位に挿入して、RNase H 活性が維持され得る部位を検索した。その結果、活性部位に近い 3 つの部位への挿入では活性は失われたが、タンパク質表面に近い 4 つの部位への挿入では活性は維持されることを確認した。

次に、その 4 つの部位のうち 1 次配列上の中央に位置する His 62 部位を選び、120～130 アミノ酸残基のランダム配列を挿入した変異体ライブラリーを作製した。大腸菌 RNase H 欠損株を用いたスクリーニングの結果、約 10 % のクローンが生育可能なレベルの RNase H 活性を維持していた。挿入変異体を含むクローンの変性・再生ゲルアッセイにより、野生型 (18kDa) より大きい、予想される分子量 (32kDa) の位置に RNase H 活性を示すバンドが確認された。塩基配列を決定した 10 個の挿入変異体タンパク質は、大腸菌内で大量発現すると主に不溶性画分に蓄積した。このうち、よく発現した 5 個の変異体タンパク質を精製した。精製した変異体タンパク質は、野生型の 0.2～1 % の比活性を示した。さらに挿入領域にランダム変異を導入することにより、活性が 3 % まで回復し、同時に溶解度の増大した変異体が得られた。変異体タンパク質の CD スペクトルの解析から、挿入されたランダム領域は、特定の二次構造をもたないこと、また、RNase H 活性の強さと挿入したランダム領域のアミノ酸組成との間には相関があり、ランダム領域のアミノ酸組成が天然球状タンパク質の組成に近い変異体ほど、活性が高い傾向のあることを見出している。

以上の結果から、二次構造を含まない可塑的な構造をもつランダムなタンパク質のライブラリーを、大腸菌 RNase HI の表面に提示できることを示した。今後、この「土台」上に提示したタンパク質のランダム配列ライブラリーを利用することにより、新しい構造や機能をもつ新規タンパク質の創出に道を開くことができると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。