

# ネオバイオ分子創生を目指した配列空間探索

松浦 友亮

## はじめに

現在、技術の発展により、これまでに存在しなかった新規バイオ分子を創り出すことが可能となってきている。アミノ酸、核酸もしくはそれを組み合わせた新規機能性分子の創生は、すなわち配列空間の探索であり、どのように空間を探索するのに依存する。ここで高次元の配列空間について解説し、筆者らの開発した膜タンパク質に特化した新たな探索方法を紹介する。

### 未踏査配列空間の探索による新規機能性分子の創生

タンパク質は20種類のアミノ酸から構成される。ゆえに長さが $N$ のタンパク質には $20^N$ 種類可能な配列を考えることができる。 $20^N$ 種類の配列それぞれを空間内の一点として考える高次元空間が配列空間である<sup>1-3)</sup>。この配列空間において $x$ アミノ酸置換で相互に変換できるタンパク質同士は(ハミング)距離 $x$ に存在する。たとえば1アミノ酸置換で到達できるタンパク質同士は距離1の近傍に存在する。簡単化のため2種のアミノ酸(0, 1)から構成されるタンパク質配列空間を考えこれを図1に示す。長さが $N$ の配列は $N$ 次元の配列空間に描写されることがわかる。

高次元空間をそのまま可視化することはできないので、20種類のアミノ酸からなる長さ $N$ のタンパク質 $20^N$ 種類の配列を圧縮して2次元に描写して考えてみる(図2)。これに各配列の任意の性質(活性, 安定性など)を適応度(fitness)と定義し、もう一つ軸を加えプロットする。その時に表れるのが適応度地形である。新規機能を持ったタンパク質分子を創り出すことは、配列空間において高い適応度をもつ点を探ることに対応する。進化分子工学は変異と選択を繰り返し行うことでタンパク質の機能を進化(向上)させる方法である。本手法は

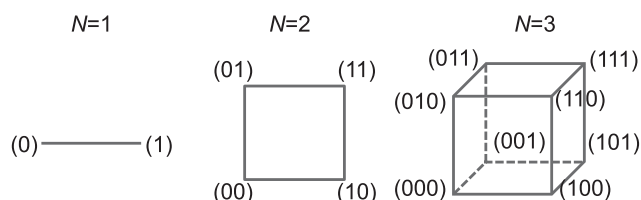


図1. 配列の長さ( $N$ )が1, 2, 3のタンパク質(ペプチド)の配列空間。アミノ酸は0と1の2種類しかないとする。したがって、長さ $N$ の配列は $2^N$ 種類存在し、それぞれの配列は $N$ 次元空間の点として描かれる。括弧内に配列を記す。たとえば、(101)は1, 0, 1の順番でつながった配列を意味する。

適応度地形の山登りに対応する(図2)。しがたって、特定の機能をもつ分子を探索するとき、目的とする分子が獲得できるかは適応度地形の形状に強く依存する。

配列空間の概念はタンパク質だけでなく、核酸を含めたポリマーにも適用できる(状態空間という概念に拡張することで生命システムを記述することも可能となる)。よって、配列空間という概念を導入することでアミノ酸、核酸もしくはそれを組み合わせた新規機能性分子のスクリーニングを同じプラットフォームで議論でき、バイオ分子の適応度地形に普遍的な性質や特徴を明らかにすることができるかもしれない(詳細は図2の脚注を参照)。

特定の機能をもつ分子を探索する、あるいは、進化分子工学により高機能分子を探索するとき配列空間を何の戦略を持たずに行うことは賢明ではないことは容易に想像がつく。100アミノ酸からなるタンパク質でも $20^{100} \approx 10^{130}$ 種類も存在し、加えて長さが異なるものも考慮するとさらにその数は増える。高機能分子を探索するために必要な戦略は(1)より多数の配列の機能を調べるこ

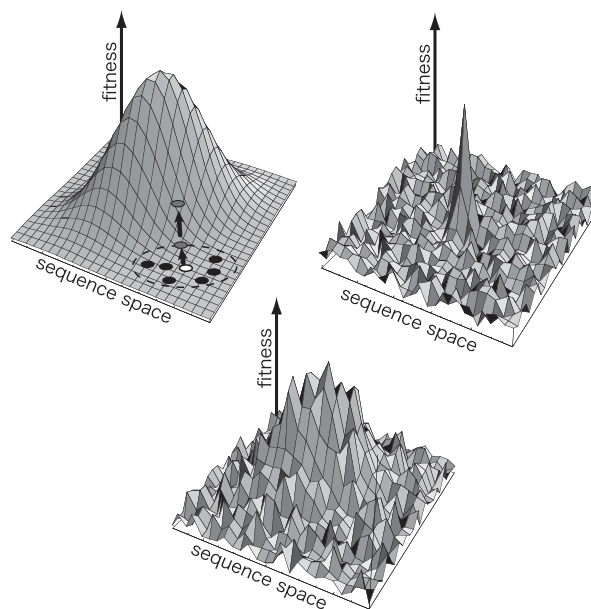


図2. 配列空間内の適応度地形。適応度地形にはさまざまな地形が考えられる。非常に滑らかな富士山型、それを凸凹にしたもの、または鋭いピークしかないような地形も考えられる。High-throughput screening (HTS)は地形において適応度の高い座標の探索に対応する。変異と選択を繰り返し行う進化分子工学は適応度地形の山登りに対応する。出発配列(○)に突然変異を導入した変異体ライブラリー(●)を作製し、これらもっとも適応度の高い配列を選択する(矢印)。これを繰り返すことでより高い適応度の変異体を取得する。

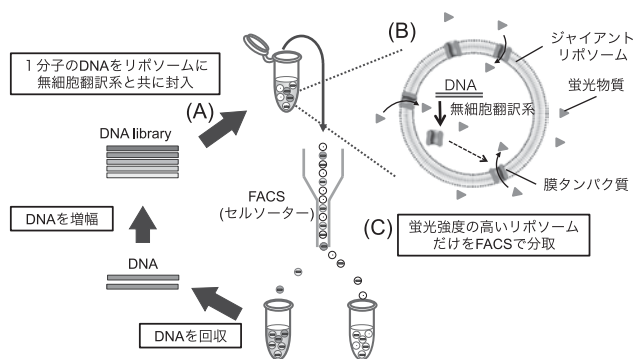


図3. リボソームディスプレイ法の概略図

と、すなわち high-throughput screening (HTS) である。もう一つは (2) 目的分子が存在していると予想される空間を探索すること。すなわち、質の高い配列のライブラリー構築である。これら二つの戦略について現在までにさまざまな技術が開発されており、本特集でも  $10^{12}$  種類もの配列の機能を調べることができる HTS の手法 (mRNA display など) から計算科学を利用したタンパク質や核酸の質の高いライブラリーの構築まで、効率的な配列空間探索に関する幅広い話題が提供されている。

HTS の技術としてファージディスプレイ法、mRNA ディスプレイ法などを含む抗体や酵素をスクリーニング対象とする技術はあったが、膜タンパク質を対象とした技術はほとんど存在しなかった。筆者らは近年これを開発し、高機能膜タンパク質を創り出すことに成功した (図3)。次節でこれを紹介する。また最後に配列空間の適応度地形を考慮する意味について議論する。

### 膜タンパク質を対象とする進化分子工学技術

筆者らは近年ジャイアントリボソームと再構成型無細胞翻訳系を用いることで膜タンパク質を対象とする進化分子工学技術を開発した<sup>4,5)</sup>。

約10年前にアメリカのグループが無細胞翻訳系を封入した細胞サイズのジャイアントリボソームを作製し、内部でタンパク質を合成する‘人工細胞’を構築する技術を報告した<sup>6)</sup>。筆者らはこの技術を発展させることで膜タンパク質の進化分子工学を達成することを考えた (図3)。まず、スクリーニングの対象とする膜タンパク質をコードする DNA ライブラリーを用意する (A)。本手法で取り扱える DNA ライブラリーの多様性の大きさは  $10^7$  程度である。次に、各リボソームに DNA を約1分子となるように再構成型無細胞翻訳系とともに封入し、リボソーム内部でタンパク質合成反応を行うと合成された膜タンパク質は膜に挿入される (B)。膜タンパク質の活性が蛍光シグナルに変換されるような仕組みをリボソーム内部に組み込んでおく。これにより高い蛍光強度をもつリボソームには高い活性をもつ膜タンパク質とそれをコードする遺伝子が含まれていることになる。蛍光強度の高いリボソームを蛍光フローサイトメーター

(FACS) で分取すると DNA ライブラリーから高機能型の膜タンパク質がコードされる分子が濃縮されることになる (C)。本手法は、合成されるタンパク質が膜タンパク質でなく酵素であって、酵素活性を蛍光シグナルに変換する仕組みがリボソーム内に組み込まれていれば、酵素の進化分子工学にも適用できる<sup>7,8)</sup>。

上記のようにジャイアントリボソームの膜上に膜タンパク質をディスプレイできることから上記手法をリボソームディスプレイ法 (liposome display) と名付けた。リボソームディスプレイ法では、ジャイアントリボソーム内で1分子の DNA を鋳型としてタンパク質合成を行うことで遺伝子型と表現型を物理的に対応させている。この手法を用いて黄色ブドウ球菌由来の pore 形成膜タンパク質である  $\alpha$ ヘモリシンの野生型よりも約30倍活性の高い変異体の取得に成功した<sup>4,5)</sup>。以上のように細胞を使うことなく未踏査配列空間を迅速かつ効率的に探索できる手法を開発し、これを膜タンパク質の人工進化に適応した。

### おわりに

これからもスクリーニング技術とライブラリー構築の組合せにより未踏査配列空間の探索が可能となり、さまざまな新規機能性バイオ分子の創生が進められていくと考えられる。配列空間という概念を導入することで、異なる生体高分子を対象とした異なるスクリーニング実験の結果を同じプラットフォームで議論できるようになるかもしれない。たとえば、任意の機能について適応度の高い山はどの程度の頻度で存在するのか<sup>9)</sup>。適応度地形の山はどの程度凸凹しているのか<sup>10)</sup>。などが興味深い点である (図2)。近年、次世代シーケンサーの登場により、大規模に配列・機能相関を調べることが可能になっており、実験結果から適応度地形を明らかにする試みが盛んになっている<sup>3,11)</sup>。さまざまなバイオ分子を創生するプロセスにおいて適応度地形の形状を明らかにすることでバイオ分子に共通する普遍的な性質を見いだせるかもしれない。今後の多種多様な分子での研究が待ち望まれる。

### 文 献

- 1) Voigt, C. A. et al.: *Adv. Protein Chem.*, **55**, 79 (2000).
- 2) Eigen, M. et al.: *Methods Enzymol.*, **183**, 505 (1990).
- 3) Romero, P. A. et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 866 (2009).
- 4) Fujii, S. et al.: *Nat. Protoc.*, **9**, 1578 (2014).
- 5) Fujii, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16796 (2013).
- 6) Noireaux, V. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17669 (2004).
- 7) Uyeda, A. et al.: *Chembiochem*, **16**, 1797 (2015).
- 8) Nishikawa, T. et al.: *Anal. Chem.*, **84**, 5017 (2012).
- 9) Keefe, A. D. et al.: *Nature*, **410**, 715 (2001).
- 10) Aita, T. et al.: *J. Theor. Biol.*, **182**, 469 (1996).
- 11) Fowler, D. M. et al.: *Nat. Protoc.*, **9**, 2267 (2014).