

ウェット・ドライ融合によるタンパク質工学研究の今

中野 祥吾

近年、タンパク質工学的手法の進歩により、触媒活性・熱安定性を改良された数多くの酵素が、産業利用されるようになった。これにはウェット実験（分子生物学や生化学実験）の技術発展に加え、コンピュータによる変異導入部位の予測やシミュレーションといった、いわゆるドライ実験の発展も大いに貢献している。ウェット・ドライ実験の融合によるタンパク質工学的手法は、酵素機能を効率よく改良するための新たな潮流、いわゆる第3の波になるといわれている¹⁾。本稿ではそれらに関するいくつかの研究について紹介したい。

次世代シーケンサーに代表されるゲノム解析技術の進歩により、数多くの酵素の一次配列情報がPubMedなどのデータベースに登録されるようになった。この莫大な配列情報を用いるタンパク質工学的手法として、コンセンサスタンパク質設計法がある²⁾。本設計法は、1. 機能を改良したいタンパク質のアミノ酸配列（以下STP）と、そのタンパク質と同じファミリーに属するタンパク質のアミノ酸配列（以下ライブラリー）を、マルチプルシークエンスアラインメント法（ClustalWやMAFFTなど）により整列し、2. もっとも高頻度に保存されているアミノ酸残基（以下コンセンサス残基）を、STPの各アミノ酸残基位置について同定し、3. STPの配列をコンセンサス残基に変異させる、という手順で実施される。本手法は自然界で多く選択されているアミノ酸残基は酵素の機能向上に寄与するという考えのもと行われる設計法で、経験則的に酵素熱安定性向上に有効なことが示されている。利点は酵素の一次配列情報だけを利用するので、さまざまな酵素に広く適用可能で、かつ簡便であることがあげられる。欠点としてはライブラリーを構成する各アミノ酸配列の選び方を失敗すると、逆に熱安定性を低下させてしまうなど、設計の目的を達成できないことがある。類似した設計法に分子系統解析の結果を加味して変異導入部位を決定する、祖先型設計法が存在する。

酵素のX線結晶構造とコンピュータシミュレーションを組み合わせて触媒活性を改変し、自然界には存在しない触媒活性を有する人工タンパク質を創製する研究も進められている。有名な成功例はケンプ除去反応（イソキサゾール環の炭素原子上に存在する水素原子を脱プロトン化する反応）を触媒する人工タンパク質（KE）の設計であろう。Rothlisbergerらはこの難題に取り組むため、まずは除去反応の遷移状態構造を予測し、その構造にもっともよく一致する活性中心構造を持つ、TIMパレル構造を有するPDB構造を4つ選別した。選別したPDB

構造について、遷移状態構造を安定化する変異をコンピュータで予測したのち、変異導入することで、目的活性を有する酵素を設計することに成功した。設計した酵素の活性は、進化分子工学的手法によってさらに改良できることが示された³⁾。ちなみにケンプ除去反応を触媒する自然界由来の酵素は、2016年時点で未だ報告されていない。

酵素の動きをコンピュータで予測し、その結果を基に触媒活性の改変を目指す試みも行われている。酵素の動きは酵素の立体構造にコンピュータシミュレーションの一種である分子動力学法（MD）を適用することで予測できる。WijmaらはMD法を応用した手法により、高いエナンチオ選択性を持つ酵素の設計に成功した。目的反応を触媒するための遷移状態構造を有する酵素のX線結晶構造を探索し、それを安定化させる変異導入部位をコンピュータで予測・導入するところはKEと同様であるが、MD法を用いて設計の成功率を上昇させているところが異なる。CASCO法と名付けられた本手法では、1. 酵素の基質複合体の構造を決定、2. 遷移状態を安定化させる変異を導入した酵素をコンピュータで自動設計（1000構造）、3. 設計した酵素の構造について短時間のMD計算（10 psec）を行い、4. MD計算中でも、予測した遷移状態と類似した構造が高度に保たれる設計酵素を選別する、という過程からなる。本手法の適用により、設計した37個の人工エポキシド加水分解酵素のうち、約25%に当たる9個の酵素は、目的とする高いエナンチオ選択性を有していた⁴⁾。

以上、近年のウェット・ドライ実験の融合により得られた研究について紹介した。読者の中には、ドライ実験の結果は何となく信頼できないと感じている方も多いと思う。しかし本稿で紹介した研究のように、ドライ実験の原理を理解し、その結果をうまく活用することで、従来のウェット実験では達成できなかった、新たな機能を持つ人工タンパク質を設計することが可能なことも事実である。ウェット・ドライ実験の融合が進み、自然界には存在しない機能を有する人工タンパク質が、今後数多く報告されることが期待される。

- 1) Bornscheue, T. U. *et al.*: *Nature*, **485**, 185 (2012).
- 2) Porebski, T. B. *et al.*: *PEDS*, doi: 10.1093/protein/gzw015 (2016).
- 3) Rothlisberger, D. *et al.*: *Nature*, **453**, 190 (2008).
- 4) Wijma, J. H. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **127**, 3797 (2015).