

研究課題名:細胞の品質管理機構による新規人工蛋白質のスクリーニング

所属研究機関名:独立行政法人 産業技術総合研究所

研究者氏名:萩原 義久

研究計画の概要

研究の趣旨・目的

自然界に見られる蛋白質は、特異的かつ強固な立体構造を持つ。本研究では多数の人工的な変異配列の中から、強固な立体構造を持つ新規蛋白質をスクリーニングする技術の開発し、アミノ酸配列と立体構造の相関を明らかにすることで、蛋白質の立体構造構築原理を解明することを目標とする。

【蛋白質構造形成機構解明へ向けてー背景】蛋白質は、その配列に特異的、かつ強固な立体構造を持つがゆえに、それぞれの蛋白質特異的な活性を発揮することが出来る。蛋白質の立体構造形成機構を理解することは遺伝情報の最終的翻訳方法を知ることであり、生物を分子論的に明らかにする上で欠かせない。問題解決へ向けて、主に天然に存在する蛋白質を対象とした詳細な研究が行われてきた。それに対し自然界には存在しない蛋白質を作り出し、既存のアミノ酸配列、立体構造と比較することで、「特異的かつ強固な構造を形成するためには如何なる配列情報が必要なのか？」という問題に対して今までは知る事の出来なかった新しい知見を得ることが出来ると期待される。それゆえ、新規人工蛋白質の創出の可能性が検討されてきたが、最近のペプチド合成技術や分子生物学的手法の進歩を受けて実践的な研究が始められている。

【既存研究の問題点と目的】現在まで、様々な人工的な変異蛋白質についての解析が活発に行なわれてきており、蛋白質の構造形成機構について有用な情報が収集されてきた。しかし、一方で部位特異的アミノ酸変異などの既存の技術を用いた研究の限界も明らかになりつつある。これは既存の技術では、最大でも数十個の人工変異蛋白質の作製、比較が可能だけであり、そこから得られる情報が限られたものにならないからである。この問題は、1)強固な立体構造を選択的に認識する、2)配列に特異的な活性などの機能情報に依存しない、3)ハイスループットである、といった特徴を持つ、蛋白質アミノ酸配列の検索方法により解決される。そこで私は、『細胞の品質管理機構』を用いたスクリーニング法の開発、改良を進め、それにより人工変異蛋白質をスクリーニング、アミノ酸配列と立体構造の相関を明らかにすることを目的とした研究を行った。

研究計画の概要

本研究では『細胞の品質管理機構』を利用して、ランダムなアミノ酸配列のライブラリーの中から強固な立体構造を持つ人工蛋白質をスクリーニング法によって得る。『細胞の品質管理機構』とは生産された蛋白質の構造状態を直接的に認識、選別する細胞機能である。スクリーニングにより得られた人工蛋白質については、アミノ酸配列とその立体構造、物理化学的性質を比較、検討して強固な立体構造形成に必要な配列情報を抽出する。

【細胞の品質管理機構とその特徴】真核細胞は分子シャペロンと蛋白質輸送系-分解系をリンクさせ、蛋白質の構造状態を管理する系を持つ。細胞はこの系によって変性した蛋白質や間違っ組み立てられた蛋白質について認識し、細胞内に留め置きそして分解する。一方、天然構造を得た蛋白質は滞り無く、細胞外へ移行する。これが『品質管理機構』である。『品質管理機構』の持つ特色、1)蛋白質の特異的かつ強固な立体構造を認識し、選択的に分泌する、2)あらゆる配列に対し、既知の情報に依存せず働く、は既存研究の問題点を解決し、新規人工蛋白質のスクリーニングを可能とする。

【品質管理機構を応用したスクリーニング】本研究では上記、『細胞の品質管理機構』の特徴を利用したスクリーニング法の開発、改良を行なった。技術開発に於ける標的蛋白質として、蛋白質の構造形成機構の研究に広く用いられている、ウシ膵臓トリプシンインヒビター (BPTI) を利用した。本蛋白質にランダム変異を導入後、スクリーニングを行ない、安定な新規変異蛋白質を得た。蛋白質の構造形成機構、特に蛋白質の変異に対する可塑性を明らかにするために、得られた変異蛋白質の熱力学的な解析を行ない、その結果を天然型の蛋白質と比較した。

. 研究計画の詳細報告

(単位:百万円)

研究項目	所要経費					
	13年度	14年度	15年度	16年度	17年度	合計
細胞の品質管理機構による新規人工蛋白質のスクリーニング	19.3	19.3	19.4			58.0
(1)ランダム配列ライブラリーの作製	19.3		12.0			31.3
(2)ランダム配列ライブラリーのスクリーニング		16.5	5.0			21.5
(3)新規人工蛋白質の大量発現系の開発と物理化学的性質の検討		2.8	2.4			5.2
(4)人工蛋白質への機能付加						
所要経費(合計) (間接経費を含む)	19.3	19.3	19.4			58.0

研究成果の概要

研究成果の概要

本研究では「細胞の品質管理機構」を応用したスクリーニングにより、ジスルフィド結合を代替するペア変異を持つ新規変異蛋白質の探索を行なった。この研究について、得られた研究成果は大きく分けて2つ挙げられる。

【1:スクリーニング系の最適化】本研究の1番目の成果は「細胞の品質管理機構」スクリーニングの改良の結果、その有用性がさらに確認されたことである。「細胞の品質管理機構」スクリーニングは申請者が開発してきたものであるが、本研究以前には予備的なスクリーニングに成功している(Hagihara, Y. & Kim, P. S., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 6619-24) だけであり、この研究で実験システムの細かい様々な改良を施すことが可能となり、スクリーニング技術の確実性、簡便性が向上した。

【2:様々な変異を受け入れる蛋白質の可塑性】2つ目は、スクリーニングの結果得られた変異蛋白質の配列比較から、S-S結合を代替するアミノ酸ペアが2系統見られたことである(1つは片方のシステインのグリシンによる置換、もう1つはバリンと疎水的アミノ酸のペア)。さらにこの2つの変異ペアの変性エネルギーを熱力学的に比較したところ、グリシンタイプの変異はエンタルピー的に有利、バリンタイプはエントロピー的に有利であることが明らかとなった。このことは、S-S結合という1種類の蛋白質の安定化因子が2つの異なる相互作用により補償され得ることを示しており、蛋白質配列の可塑性についての新たな知見を得た。

波及効果、発展方向、改善点等

【波及効果】本研究で改良、発展させた「細胞の品質管理機構」スクリーニングは産学両方面で注目を浴びてきている。本年度はこのスクリーニング技術について、招待講演を行った(萩原 義久、「細胞の品質管理機構」を応用した蛋白質改良技術」、大阪大学吹田キャンパス、大阪大学蛋白質研究所セミナー・タンパク質の構造・機能発現の品質管理 凝集と再生、平成15年6月6日)。また、現在、このスクリーニング技術を利用して、バイオベンチャー企業と医療用蛋白質の生産性の向上を目指した共同研究を行っている。

【本研究に残された課題】本研究では、「細胞の品質管理機構」スクリーニングの開発と改良を行い、成功裡にS-S結合を置換するアミノ酸ペアを探し出した。これは「細胞の品質管理機構」スクリーニングの応用例としては2つ目であり、汎用性を確かめるためにはBPTI以外の複数の蛋白質でスクリーニング実験を今後も引き続き行う必要があると思われる。その標的として現在考えているのは抗体を構成する免疫グロブリンフォールドドメインである。

【今後の発展方向—細胞内で働く抗体】免疫グロブリンフォールドドメインは約100アミノ酸で構成され分子内に1本のS-S結合を持つ。代表的なものに、免疫グロブリンや、2ミクログロブリン等が知られている。数種類の免疫グロブリンフォールドドメインについて、そのS-S結合をランダムにシステイン以外のアミノ酸に置換し、最も安定性の高いものを「細胞の品質管理機構」スクリーニングにより選択する。得られた変異配列をそれぞれ比較し、複数の免疫グロブリンフォールド中のS-S結合をユニバーサルに置換する変異があるのか否かを確かめる。仮に、ユニバーサルに置換するペアが見つかった場合、この変異を導入することで、今までは困難であった原核生物による免疫グロブリンの生産が可能になるかもしれない。また変異体を熱力学的、構造学的に解析し、何故、その変異がS-S結合を代替するのか明らかにすることで、アミノ酸配列と蛋白質の安定性の関係についての新しい知見が得られるものと期待される。

免疫グロブリンフォールドからS-S結合を取り除くことは、蛋白質の構造形成機構を考える上で興味深いだけではない。最近、細胞内で抗体を活用しようとする試みがなされており、この用途に用いられる抗体はIntrabodyと呼ばれている。この場合、抗体すなわちIntrabodyは細胞内で抗原となる蛋白質の機能を阻害するものとして働くはずである。Intrabodyを利用して、癌治療や植物の改良を行おうとする基礎的な実験が行われている。しかし、Intrabodyを広く用いるためには本質的な障害があり、それは細胞内が還元条件であるため、構造の維持に重要な役割を果たすIntrabody内部のS-S結合が細胞内で還元され、本来の機能が発揮できなくなると考えられるからである。そのため、上記の実験の結果、免疫グロブリンフォールドから安定性の低下を抑えながらS-S結合を除去できれば、これはIntrabodyの骨格として最適の性質を持つものと考えられる。

. 研究成果発表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	0 件	3 件	3 件
国 際	1 件	0 件	1 件	2 件
合 計	1 件	0 件	4 件	5 件

(2) 特許等出願件数

なし

(3) 受賞等

なし

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国外誌

1: Hagihara Y, Shiraki K, Nakamura T, Uegaki K, Takagi M, Imanaka T, Yumoto N, [Screening for stable mutants with amino acid pairs substituted for the disulfide bond between residues 14 and 38 of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)], *J. Biol. Chem.*, **277** (52), 51043-51048

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (J. Biol. Chem.)	7.258

