

## 7.5 学位論文要旨 (別紙様式博5)

### 学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 倉橋 亮

題目 : Insight into the relationship between activity and stability during protein evolution  
(タンパク質進化過程における活性と安定性の関係に関する洞察)

本研究は、タンパク質進化過程におけるタンパク質安定性の役割を解明することを目的として、超好熱菌アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来エステラーゼ (Sto-Est) を用いたランダム変異浮動実験から活性と安定性の関係を検証・探求し、得られた知見を基に高機能化酵素の新たな効率的な獲得法を提案するものである。

#### Chapter 1: General introduction (序論)

進化は生物独自の特徴であるがゆえに、その研究は生命現象を理解するうえで大変重要である。しかしながら、生命の起源や進化過程に関してはまだまだ未知の部分が多い。進化の主な要因の一つは、タンパク質に直接影響を及ぼす遺伝子変化 (突然変異) である。したがって、タンパク質は進化研究において最適なモデルであるといえる。また、タンパク質進化学は、目的の特性を有するタンパク質を作製するのに有効であり、広く普及している。

アミノ酸変異はタンパク質の環境適応や新機能の獲得を可能にする点で進化にとって有益であるが、その変異のほとんどがそのタンパク質を不安定化してしまうといった問題に直面する。そのため、様々な変異を受容するだけの安定性が進化にとって重要であると考えられているが、その詳細はまだ明らかでない。そこで本研究では、進化過程における安定性の役割を解明するために、Sto-Est のランダム変異浮動を調べた。ここで、変異による活性向上をタンパク質進化と位置付け、新たな指標として *evolvability* (テンプレート (親タンパク質) よりも活性が向上した変異体の割合) と *robustizability* (テンプレートよりも安定性が向上した変異体の割合) の2つの評価軸を定義し、それぞれを比較することで議論を進めた。これらの知見から、タンパク質進化学分野への応用を目指し、高機能酵素の効率的な獲得方法を提案した。

#### Chapter 2: Methods (研究方法)

Sto-Est を用いたランダム変異浮動実験系を構築した。Sto-Est 遺伝子に対し、Error-prone PCR を用いてランダム変異を導入し、増幅したランダム変異遺伝子は大腸菌用発現ベクターに組み込み、組換えタンパク質を大腸菌にて大量発現させた。それぞれのランダム変異タンパク質を粗抽出し、活性測定及び安定性評価を行った。その中から特徴的な変異体を選抜し、次のラウンドへと供与した。また、変異タンパク質の配列決定を行い、活性と安定性の変動理由を考察した。

#### Chapter 3: Protein stability potentially governing protein evolution (タンパク質進化を潜在的に支配する安定性)

ランダム変異後の第一世代ライブラリでは、20%の変異体タンパク質がテンプレ

ートタンパク質よりも活性を向上させた (Evolvability; 20%)。つづいて、異なる安定性をもつテンプレートタンパク質にそれぞれランダム変異を導入し、世代を追跡した。その結果、進化過程において、各世代の *evolvability* はテンプレートの安定性に依存していた。これは、タンパク質進化がその安定性によって潜在的に支配されているということを意味している。さらに、活性が低下した変異体は安定性を維持することによって、その後の世代で活性を回復することができた。この結果は、タンパク質進化における配列空間が、安定性を有する弱有害変異 (ほぼ中立進化) により拡張することができることを示唆している。

#### Chapter 4: Activity-stability trade-off in random mutant proteins and a proposal for application (ランダム変異タンパク質における活性と安定性のトレードオフと応用への提案)

第3章より、各世代の *evolvability* はテンプレートの安定性と正の相関がみられたことから、安定性を考慮に入れない進化は意味をなさないと言える。そこで本章では、ランダム変異後の活性と安定性の関係をさらに精査した。その結果、多くの活性化変異体はテンプレートの安定性が高い場合に生産される一方で、安定性が低いと非常に高い活性をもつ変異体を得る可能性があることを見出した。つまり、活性を向上させるには、安定性を犠牲にしなければならないことを示しており、活性と安定性のトレードオフが働いていた。さらに、新たな指標として *robustizability* を評価した。各世代における *robustizability* はテンプレートタンパク質の活性と正の相関を示したのに対し、テンプレートの安定性とは逆の相関を示した。以上の結果、ランダム変異浮動においても、活性と安定性のトレードオフという原理が強く支配しているということが明らかとなった。

そこで今回の知見から、タンパク質進化工学における新たな手法を提案する。まず第一段階では、配列空間を広く探索するために、安定性を指標とした定向進化を行う。この段階で、ランダム変異実験を複数回行うことによって安定性を維持した、あるいは少し低下した変異体を多数選抜する。つぎに第二段階として、活性を指標とした定向進化に移行する。この二段階法で重要なのは、第一段階での変異ライブラリの多様性であり、これらの変異体を用いた第二段階実験により最高活性を示す変異体が高くなる。本手法により、広範囲な配列空間の探索と活性と安定性のトレードオフ問題の回避が期待できる。

#### Chapter 5: Conclusion (総括)

タンパク質の進化と安定性の関係を調べるために、異なる安定性を示すランダム変異体を用いて比較実験を行った。その結果、安定性は進化にとって重要な因子であることを実験的に証明した。また、安定性は活性を向上させるための配列空間探索に必須であることがわかった。以上、タンパク質進化において、タンパク質の安定性は構造を維持するだけでなく、その進化をも支配しているという新たな知見を見出した。さらに、これらの知見を基に効率的な活性向上変異体の作製に対する新たなアプローチを提案した。本手法は、タンパク質進化工学の発展と産業分野への貢献が期待される。