構造から見た蛋白質工学

大阪大学・蛋白質研究所 田 中 信 夫

Nobuo TANAKA : The Protein Engineering and the Structure of Proteins.

The protein engineering is expected to bear fruitful products from the industrial and scientific aspects. It is entirely based on the three dimensional structure of proteins. The recent studies on the protein structures by X-ray suggest how to modify the protein by replacement of an amino acid residue into the other. The useful protein which has not been found in the natural world will be also produced by the protein engineering, inspecting the protein structure carefully. [J. Cryst. Soc. Jpn. 29, 38 (1987)].

最近の生化学の発展によって生体を構成している蛋白質や遺伝子等について多くの事が明らかにされており、それらの構造と機能の関連等についての研究も広く行われてきた。蛋白質は生体を形成する構造蛋白質（皮ふや腱等）と生物が摂取した食物を消化しエネルギーを獲得する反応を触媒する蛋白質（酵素）に大別されるが、機能との関連において後者が興味深くよく研究されており蛋白質工学の対象となっている。これまでの研究から蛋白質分子は20種類のL-アミノ酸[†]が脱水縮合によって一次的につながったペプチド鎖といくつかの低分子化合物や金属イオンから成立っており、各々の酵素はそれぞれ決まった基質とのみ反応する特異性のあることが明らかとなってきた。ある生物が持っている特定の働きをする蛋白質を構成しているアミノ酸の種類と配列は一定であり一次構造と呼ばれている。後述のように蛋白質の機能は立体構造から説明されるが、一次構造は立体構造を決定する要素であり、従って、機能に強く結びついている。しかし、生物によっては isozyme と呼ばれ機能的には同じ働きをするが一次構造の少し違う分子が存在しており、同じ機能を示す蛋白質でも生物が違くと分子量や一次構造に大きな差があることがある。更に、同じ生物でも機能が違くと分子の大きさやアミノ酸組成に差があり、一見統一的には取扱えない程複雑なものと思われてきた。しかし、最近の蛋白質結晶解析法による研究の進展によりこれらの問題点に対し解答を与えることができるようになってきた。即ち、いろいろな生物に多くの種類の蛋白質がありその一次構造は多様であるが、その立体構造はいずれの場合でも α -ヘリックス、 β -シート、ターン等のいくつかの一定の形をした、二次構造の集合として記述できることがわかってきた。更に、これらの二次構造が集まって形成される超二次構造もいくつかの型に分類されそれ程多様でないようである¹⁾。構造の面から興味ある点は、当然ではあるが、蛋白質が機能を発現する際に生物だからと言って特別な仕掛けがあるわけではなく、立体化学的に理解できることである。むしろ、蛋白質における特長は反応に関与する原子の数が多い事であろう。例えば、蛋白質を消化する酵素で活性にセリンが関与するセリンプロテアーゼと呼ばれるいくつかの蛋白質があり、その分子構造が決定されているが、いずれの場合にもその活性部位には多くのアミノ酸側鎖が関与していた（第1図）²⁾。このように機能の少し違う蛋白

[†] RS表示方法によればシスチンはS体、それ以外のアミノ酸はR体である。

質で活性部位の構造が同じである事はよくあることで生物の進化と関係していると考えられている。このような蛋白質の間の差は活性部位以外で基質を認識する場所で見出されている³⁾。

このように蛋白質の構造化学的な情報が蓄積されると各アミノ酸側鎖の役割に注目し、あるアミノ酸を他のアミノ酸に置換した場合、その蛋白質の機能がどのように改変されるであろうかという純学問的な興味をひき起すであろう。また、工業的にも蛋白質の選択的な機能に注目し、医薬品やセンサーとして役立つ物質を創造するため蛋白質を利用する方法はないかと模索されてきた。このような学問的、工業的要求と最近急速に発展してきた遺伝子工学が結合し蛋白質工学が誕生し、新技術として注目されるようになってきた。今まで述べてきたように蛋白質工学には分子の立体構造が必須のものであり、結晶解析の研究がもっと進むことが強く希望されている。しかし、これまでの解析結果からも多くのことを学ぶことができ、アミノ酸の置換も全くでたらめでは駄目なことも示唆されている。以後、今までの解析結果から蛋白質工学に学ぶことができる点について述べてみよう。

1) 三次構造の保持は重要である

ある酵素の任意の場所のアミノ酸を他のアミノ酸と置きかえることは最近では比較的容易になってきた。しかし、酵素の機能(活性)を保持させようとすれば、このような置換によっても三次構造に大きな変化のないように立体化学を満足するものでなければならない。分子表面に露出しているアミノ酸の場合にはその立体的要因はそれ程問題とならず、むしろ、電気的な性質が保持されるように変化するが、分子に埋れているアミノ酸の場合にはその大きさが重要な要因となる。このことは立体構造が決定された蛋白質についてその類縁分子(例えば違った生物の同種蛋白質等)の一次構造を比較することにより明らかとなってきた。一般的にアミノ酸の変化は同じ様な大きさのアミノ酸に変化するが、たまには体積の大きいものに変化することがある。この場合には立体構造を保持するためそれに接するアミノ酸を小さなものに変える必要がある。次に、これらの点について我々の研究してきたCu, Znスーパーオキシドディスムターゼの結果から述べてみよう。本分子は三次構造については我々の決定したホウレン草から抽出した分子とウシ赤血球⁴⁾から抽出した分子が決定されており、一次構造も多く分子で決定されている。本酵素はアミノ酸数が約154の副単位が2つ集まって構成されており、活性部位は銅イオンとヒスチジンで構成されている。亜鉛イオンは活性部位の近傍に存在し構造安定化に役立っているようである。ウシとホウレン草の分子構造はその一次構造が約40%も違っているにも拘らず殆ど同じであった。しかし、局所的に構造の変化している所が数ヶ所あり、その1つとしてアミノ酸がグリシンとロイシンと大きさが大きく異なった33番目の所で見られる。このアミノ酸は構造研究の結果97番目のアミノ酸と接触しており、この2つのアミノ酸を多くの分子について比較してみると殆どの場合、一方が大きければ他方は小さくなってお互いに空間的に補償されていることが明らかである

第1図 セリンプロテアーゼの活性部位。
文献2)より引用。

第2図 ホウレン草の葉から抽出したスーパーオキシドディスムターゼの立体構造。
ペプチド鎖は棒形式で表示し、大きな丸でCuイオンを、小さな丸でZnイオンを表示している。

(第1表)。このような関係を満足することによって構造変化を局所的に限定することができ立体構造を維持することができる。このように考えていくと生物毎に一次構造が違っていても活性を示すためには一定の規則でアミノ酸置換が起こっており、従って、蛋白質工学において任意の場所のアミノ酸を変化させる site directed mutagenesis は注意深く行う必要がある。

2) 二次構造の保持も必要である

先述のように蛋白質には金属イオンを結合している場合がある。金属イオンはアミノ酸の側鎖によって配位結合を形成している。しかし、構造解析の結果からこの配位結合に参加しているアミノ酸はしっかりした二次構造体、例えば、 α -ヘリックスや β -シートに属している。このように二次構造の重要性を示す他の場合としてリゾチームを挙げるこ

とができる。本酵素は細胞壁を溶かす機能を持っているが、ニワトリ卵白、ガチョウやT4ファージから精製した分子について構造が研究されており、いずれの分子もいろいろな大きさの β -構造体がつながっていることが明らかとなった。そして、各々の分子でそれらのつながり方に差があるが、その様式には相互に関連があり生物が進化してきた過程と相関があるようである⁵⁾。従って、T4-リゾチームを改造してニワトリ型リゾチームを作れるのでないかと

第3図 ウシとホウレン草のスーパーオキシドディスムターゼの間の構造の差。
太線：ホウレン草，細線：ウシ

第1表 スーパーオキシドディスムターゼの一次構造の比較

残基番号	33	97
生物種		
Bovine	G	V
Spinach	V	A
Porcine	G	V
Human	G	V
Horse	G	V
Fish	I	I
Fly	G	V
Yeast	Y	G
N. crassa	Y	G

G：グリシン A：アラニン

I：イソロイシン V：バリン

Y：チロシン

グリシンとアラニンは小さな側鎖で他はかさ高い側鎖である。

第4図 ガチョウ、ニワトリ及びT₄ファージリゾチームの構造比較。

a) ガチョウの二次構造, b), c), d) はそれぞれガチョウ, ニワトリ, T₄ファージの構造を示す。黒い部分は全てに対し共通, GHはガチョウとニワトリ, GTはガチョウとT₄ファージで共通な部分である。

(勝部幸輝, 三井幸雄「続分子進化学入門」今堀宏三, 木村資生, 和田敬四郎: p. 232 より引用)

構造解析の結果は示唆している。しかしこのような考え方は本当かどうかは遺伝子工学等の技術を利用して実証しなければならない。

3) 新しい蛋白質の設計

いろいろな生物から精製した同じ働きを示す蛋白質を比較してみると、構成アミノ酸が大幅に違う場合にもその立体構造はほとんど同じである。さらに興味ある点はいくつかのアミノ酸が挿入されたり欠損している場合もあり、その場合にも同じような機能を示す。このような事実は蛋白質をかなり改造しても同じような働きを示す分子を作ることができることを示唆している。生物が作る蛋白質の構造はその機能が最もうまく発揮できるとともに代謝による消失等存在するシステムとの整合性も考慮されている筈である。他方、現在の蛋白質工学において要求されているのは特異的な選択性を示す機能であり、この点のみを強調した分子を設計することが可能であろう。このような研究は例えば、Dihydrofolate reductase において報告されている⁶⁾。この酵素は、7, 8-dihydrofolate を 5, 6, 7, 8-tetrahydrofolate に還元する機能を持っている。本酵素のアミノ酸置換は、27 番目(Asp→Asn), 39 番目(Pro→Cys), 95 番目(Gly→Ala)で行われている。39 番目に導入されたシステインのイオウ原子は立体構造を検討してみると、自然の分子に存在するシステイン-85 の側鎖と S-S 結合を作ると期待されたが、実際にはうまくいかなかったようである。他方、27 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに改変すると活性がほとんど無くなることから Asp-27 が活性部位を形成していることが明らかとなる。非常に興味ある置換が 95 番目のグリシンからアラニンの置換で見られる。このアミノ酸は活性部位を形成していないが、この置換によって完全に失活する。この理由として -Gly 95-Gly 96- と続く非常に柔かいペプチド鎖が、アラニン置換によって構造変化を起こし補酵素である NADPH の結合を阻害するためと考えられている。

更に進んで自然界に存在するものを修正するのではなく全く新しい分子を創造し結晶化に成功したことが報告されている⁷⁾。この研究では 12 又は 16 個のアミノ酸からなる α-ヘリックスの構造をしたペプチドを合成している。実際にはペプチド鎖が 4 本集まって、ミオグロビン等で見られる α-ヘリックスの集合のモデルとなると期待されている。本研究では小さなペプチドであったので固相重合法で合成されたが、もう少し大きなペプチドや蛋白質で

第5図 カタラーゼの立体構造。(a) *Penicillium vitale* (b) ウン肝臓
前者の主領域は後者と同じ構造である。

は遺伝子工学の手法を使う必要がある。

蛋白質の機能は極めて選択的であり、生物においては種々の蛋白質が連鎖的に違った機能を発現し生命を維持している。従って、2種類の蛋白質を結合して多機能分子を設計することが可能である。このことは自然界でもよく見られることで、一例としてカタラーゼを挙げることができる⁸⁾。カタラーゼの構造研究は牛肝臓から抽出した分子と細菌から得られた分子について行われており両者の構造は極めて類似していた。しかし、細菌からの分子には余分にフラボドキシンと呼ばれる分子に類似した部分が付加しており、結局、細菌からのカタラーゼはウシカタラーゼとフラボドキシンの融合した分子とみなすことができよう。このように生物は分子を融合したり分離したり比較的自由に行っており、このような変化によって外界の変化に対応し生きている。従って、我々もこのような方法で人間の必要とするものが創れるものと考えられる。

今まで述べてきたように新技術としての蛋白質工学は多くの実りある結果をもたらすものと期待される。このための技術としては遺伝子工学、固相重合法、化学的修飾法等があるが、その基礎として分子構造を明らかにすることが必要でもっと多くの研究が行われることが期待されており、蛋白質結晶学が注目されている。そのために我々結晶学者は測定システムや解析理論の開発等を通じて大いに寄与できるものと確信している。

文 献

- 1) 例えば G. E. Schulz and R. H. Schirmer : *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1978) にまとめられている。
- 2) D. M. Blow, J. J. Birktoft and B. S. Hartley : *Nature* **221**, 337 (1969).
- 3) J. Kraut : *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 331 (1977).
- 4) J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson and D. C. Richardson : *Nature* **306**, 284 (1983).
- 5) M. G. Grutter, L. H. Weaver and B. W. Matthews : *Nature* **303**, 828 (1983).

- 6) J. E. Villafranca, E. E. Howell, D. H. Voet, M. S. Strobel, R. C. Ogden, J. N. Abelson and J. Kraut : Science **222**, 782 (1985).
- 7) D. Eisenberg, W. Wilcox, S. M. Eshita, P. M. Pryciak, S. P. Ho and W. F. DeGrado : Proteins **1**, 16 (1986).
- 8) W. R. Melik-Adamyan, V. V. Barynin, A. A. Vagin, V. V. Borisov, B. K. Vainshtein, I. Fita, M. R. N. Murthy and M. G. Rossmann : J. Mol. Biol. **188**, 63 (1986).