

**Confidential**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Date | 2022/09/22 | Description | 新規作成 | | | | | | |
| Issue | 横河電機 MKHQ INVC | | | Author |  | Check |  | Approval |  |
|  |  | | |  |  |  |  |  |  |
|  |  | | |  |  |  |  |  |  |

Form Y-E31-2　Size A4

**３．２　要素技術の現状**

**３．２．１　類似度90%以下の変異体の創製**

* Rosettaを利用した変異体探索

本項では、Rosettaの設計プロトコルに変異数制約を加えた上位最適化を組み込むことで、全探索やランダム探索よりも効率的に変異体を生成（サンプリング）した。Rosettaの設計プロトコルは、Cartesian DDGを使用した。Cartesian DDGは、Wild-Typeのアミノ酸配列の変異位置・残基を入力すると、それに整合するように最小化されたエネルギー変位スコア（ΔΔG）と構造データを出力する。しかしながら、指定した変異数内での候補配列を得るには、全探索やランダム探索は非効率である。よって、候補生成の効率を上げるために、Cartesian DDGに上位最適化を組み込んだ技術を検討した。

図1に今回検討した技術の概要を示す。指定した変異数内の変異位置・残基の組を、上位最適化の最適化変数に設定し、目的関数値であるエネルギースコア（ΔΔG）を最小化する、最適化問題を構築した。最適化アルゴリズムはLocal Searchを使用したため、局所解のいずれかに収束する。

図2に三点変異を指定した場合の探索結果の一部を示す。1CBH（Wild-Type）のスコアよりも大きく改善した変異体が得られていることが確認できる。

**３．２．２　変異体の評価**

* AlphaFold2の信頼度スコアによる変異体評価

AutoDock Vinaや分子シミュレーションなどを用いて、CBD変異体を机上評価しているが、これらはセルロース結晶とのドッキングスコアやダイナミクスを評価しており、立体構造へフォールディングする妥当性を評価しているものではない。一方、AlphaFold2[1]は、2021年に登場した、アミノ酸配列からその立体構造を高精度で予測する技術で、予測構造の信頼度スコア（pLDDT）を計算し、それを高めるように学習する。AlphaFold2の信頼度スコアは、熱力学的なスコアに基づくものではなく、学習データに基づいて統計的な観点で計算されるため、他のスコアとはある程度独立的に、立体構造の妥当性を評価できる。一方、AlphaFold2はPDBの天然タンパク質を中心に適用されており、設計した変異体については適用例がない。このため、本テーマで設計したCBD変異体の配列について、信頼度スコアを用いて、立体構造へフォールディングする妥当性を評価してみた。

コムギ胚芽無細

**３．２．３　データからの特徴抽出**

本項の目的は、机上評価とは別に、セルロース分解酵素、特にセルロース結合性タンパク質（CBD）の配列・構造データに共通する特徴を抽出することである。これは、変異体探索で共通特徴を制約として課すことで、より効率的に候補配列を得ることが期待できる。

* パブリックデータベースからの特徴抽出

本検討は、パブリックデータベースで公開されている構造データを使用し、Linker配列・EGFP配列（C末端にTEVプロテアーゼ認識配列＋6xHISタグ付加、以下EGFP-TEV-HIS配列）をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成に至適化されたpEUベクターに組み換えた。MCS内の5’側からEcoRV認識配列とKpnI認識配列の間にCBD配列を、KpnI認識配列とNotⅠ認識配列の間にLinker配列を、NotⅠ認識配列とSmaI認識配列の間にEGFP-TEV-HIS配列を組み換えた。ただし、NotⅠは8塩基認識のため、フレームがずれないようにNotⅠ認識配列の前に1塩基挿入した。CBD配列・Linker配列・EGFP配列についてはピキア酵母発現系に用いることを想定し、コドン最適化を行った。人工遺伝子合成・組み換えは日本ジーンウィズ株式会社に委託した。

* 実験データからの特徴抽出

構築したコムギ胚芽無細胞タンパク質合成用の発現ベクターをテンプレートとしてタンパク質合成を行った。合成（1.2mL）には株式会社セルフリーサイエンスの合成キット(WEPRO7240H Core Kit)を用いた。まず mRNA 転写反応(37℃、6 時間)を行った。mRNA 転写物は 0.5 μL 分をアガロース電気泳動(1%)にて確認した(図)。その後、96 ウェルプレート(227 μL合成)ないし 24 ウェルプレート(1.2 mL 合成)中で重層法による翻訳反応(15℃、20 時間)を行った。重層法による翻訳反応はプレート中に翻訳バッファー(上層)をまず入れておき、翻訳反応液(下層)をその下に入れて重層を形成させて行った。それぞれの反応組成は下記の通りである（表）本合成の可溶性画分より His タグを利用したアフィニティー精製を行った。得られた精製タンパク質は Nanodrop による濃度測定および SDS-PAGE により確認した。

**参考文献**

[1] AlphaFold2の文献