**研究成果報告書：変異体探索 人工酵素設計PJT**

目次

1. **はじめに1**

1.1　本書の位置づけ2

1.2　研究の背景2

1. **理論、システム構成4**

章のタイトル (レベル 2) を入力してください5

章のタイトル (レベル 3) を入力してください6

1. 実験結果**4**
2. 考察**4**
3. まとめ**4**
4. 参考文献**4**
5. 付録**4**
6. **はじめに**
   1. **本書の位置づけ**

本書は、人工酵素設計PJT（2020年3月～2022年10月）の要素技術の一つである「変異体探索」の調査研究の概要・実施結果について報告を行うものである。

* 1. **研究の背景**

Wild-Typeのアミノ酸残基の改変によって変異体を生成するアプローチは、有用な酵素を人工的に設計する上で期待できる。本PJTでは、類似度90%以下の変異体を生成することを目標としていた。一方、変異数が多いと、Wild-Typeから大きく離れるため、タンパク質立体構造のフォールドが不安定になる、本来の機能を失うなどの可能性が高くなる。よって、変異数を制限しながら、優良なWild-Typeの変異体候補を効率的に生成する方法は有力だと考えられる。

Rosettaは、酵素設計のためのRosetta Enzyme Designソフトウェアである。その机上設計プロトコルとして、FastDesignやCartesian DDGがある。FastDesignは、Wild-Typeのアミノ酸配列の配列長や残基を変更し、エネルギースコア（Rosettaスコア）が最小となるような変異体を生成する。また、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スコア（Rosettaスコア）と構造データを出力する。しかしながら、FastDesignには変異数を制限する機能がない、あるいはCartesian DDGはユーザが変異位置・残基を指定する必要があることが要因で、これらの設計プロトコルは、変異数を制限しながら、Wild-Typeの変異体候補を効率的に生成することを実現しにくい。

以上から、本検討では、変異数制約を満たすWild-Typeの変異体候補を探索・生成する方法を確立した。具体的には、Cartesian DDG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する。

1. **理論、システム構成**

類似度90%以下の変異体生成のために検討した技術について説明する。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（Rosettaスコア）を最小化するような、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。

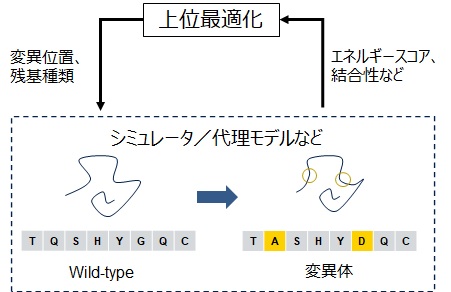


図1：変異体探索プロトコルの概要

1. **実験結果**

図2に、1CBHのWild-Typeに三点変異を指定した場合の探索で得た、変異体の立体構造例を示す。三点変異体のアミノ酸残基に変異した部位を紫色で示している。Wild-TypeのRosettaスコアは-127.9だが、三点変異体のRosettaスコアは-157.8であるため、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。

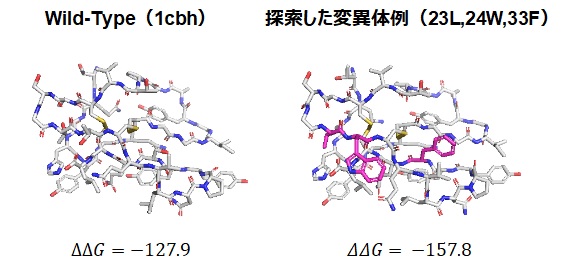


図2：1CBHの三点変異体の主鎖構造（紫色は変異部分）

1. **考察**
2. **まとめ**
3. **参考文献**
4. J. Jumper et al.: “Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold”, Nature (2021)
5. M. Mirdita et al.:“ColabFold: Making protein folding accessible to all”, Nature (2021)
6. T. Kosugi et al.:“Solubility-Aware Protein Binding Peptide Design Using AlphaFold”, Biomedicines, Vol.10, No.1626 (2022)
7. 中林：「2019年度 共同研究最終報告書「人工セルラーゼ設計手法の開発に向けた要素技術の調査研究」」（2020）
8. **付録**