

# 研究報告書

## 「細胞機能の制御・設計に向けたアロステリックタンパク質の人工設計」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年4月～平成29年3月

研究者: 古賀 信康

### 1. 研究のねらい

タンパク質分子はアミノ酸配列に従い、ほどけた紐のような状態から自発的に折りたたまり特異的な三次元立体構造を形成して機能を発現する。生命は何十億年という長い年月をかけてタンパク質を進化させ、それらを生命システムにおけるパーツとして巧みに利用し様々な生命現象を生み出している。しかし、我々が現在見ている自然界のタンパク質は個々の環境に応じて進化した結果であり、それらを解析するのみでは自然が創り上げたタンパク質分子の動作メカニズムの本質に辿りつくことは難しい。そこで、立体構造形成や機能発現に関する様々な仮説を立てながらタンパク質分子を計算機上で設計し、それらが実際にどのように動作するのか実験により調べるという構成的アプローチが力を発揮する。タンパク質分子を実際に創ることにより立体構造形成および機能発現の原理を理解し、さらに望みの機能を発現するタンパク質を自在に設計できる技術を確立する。本研究では、アロステリックタンパク質を設計することに着目し研究を展開する。アロステリックタンパク質は、リガンド結合や光などの外部入力により立体構造を変化させてスイッチのように機能発現を制御することにより、様々な生命現象を適切な位置とタイミングで発現する。アロステリックタンパク質の示すこの動的な機能は、タンパク質構造に精巧に組み込まれた「折りたたみ」「少分子結合」「構造変化」「多量体形成」などの複数の「機能要素」が組み合わさって生じる。本研究では、アロステリックタンパク質をゼロからデザインすることを大きな目標としながら、上記のそれぞれの機能要素の理解とそれらをデザインする技術、更にはそれらの機能要素を一つの分子に組み込む技術の開発を行うことを目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

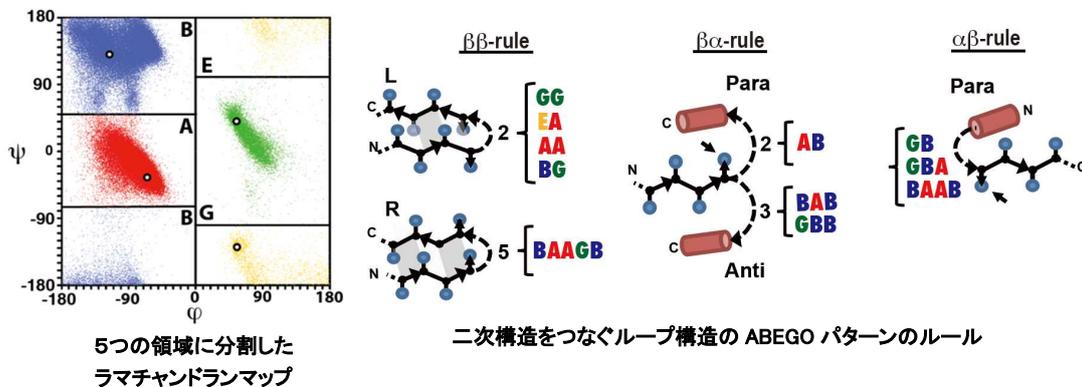
ATP 結合および加水分解に重要とされる P-loop motif を持つアロステリックタンパク質のデザインを目標として研究を行った。まず、「折りたたみ」に着目して研究を行い、我々がこれまでに開発してきたタンパク質立体構造をゼロからデザインする技術を発展させ、様々な形状の  $\alpha/\beta$  型タンパク質構造および  $\alpha$  ヘリカル構造をデザインする手法を開発した。その結果、2次構造を連結するループ構造に主鎖二面角パターンが存在することを明らかにし、これらの主鎖二面角パターンを用いることで 4 本および 5 本ストランドからなる様々な形状の  $\alpha/\beta$  型構造、 $\alpha$  ヘリックス 5 本からなる  $\alpha$  ヘリカル構造のデザインに成功した。次に「少分子結合」に着目してデザインを行った。我々が発見した前述の主鎖二面角パターンと、自然界のタンパク質である分子モーターや Ras 等において、ヌクレオチド結合・加水分解に伴う構造変化に重要とされる P-loop motif を用いることで、 $\alpha/\beta$  型構造を持つリン酸結合タンパク質のデザインに成功した。アロステリックタンパク質のゼロからのデザインは道半ばであるが、その土台となる研究成果

を得ることができた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「折りたたみ」

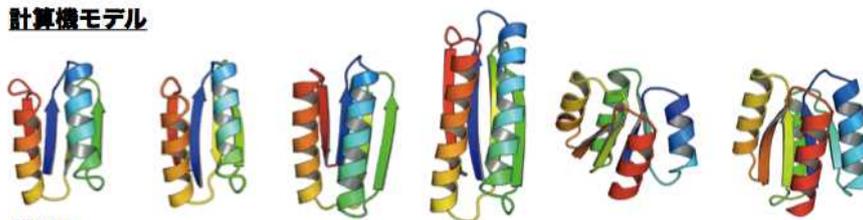
タンパク質の機能は、アミノ酸配列に従って折りたたまれたその立体構造に基づいて発現される。すなわち、望みの機能を持つタンパク質構造をデザインするためには、自在にタンパク質構造をデザインする技術の確立が必要不可欠である。そこでまず望みの形状や大きさのタンパク質をデザインする手法の開発を行った。タンパク質分子は、アミノ酸がペプチド結合で連なったものであり、タンパク質分子の様々な立体構造は、ペプチド結合面同士の主鎖二面角( $\phi$ ,  $\psi$ )が変化することにより生み出される。これら二面角の範囲は局所的な原子同士の排除体積により制限されていることが知られ、これらはラマチャンドランマップとして表現されている。我々は、ラマチャンドランマップを5つの領域(A,B,E,G,O)に分割し(左下図)、このABEGOタイプを用いて二次構造をつなぐループ構造について、自然界のタンパク質構造を網羅的に解析したところ、ループ構造に主鎖二面角パターン、すなわち ABEGO パターンのルールが存在することを明らかにした(右下図)。これらのルールを用いてループ構造を設計することにより、ループ両端に接続されている二次構造間の相対位置を制御することができ、タンパク質の形状を制御することが可能になる。加えて、連続する3つの二次構造(beta-alpha-beta motif)に関して、それらを連結しているループの ABEGO パターンに応じて  $\alpha$ ヘリックスと  $\beta$ ストランドの長さを選ぶことで、タンパク質の大きさを制御することができる。



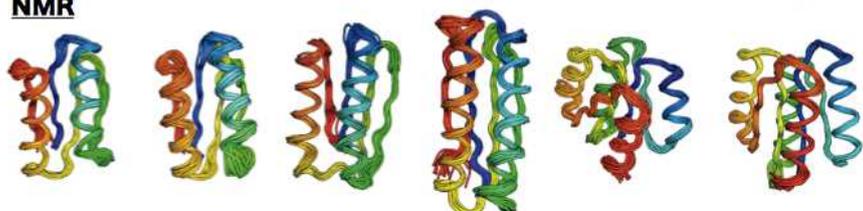
発見した ABEGO パターンのルールを用いて、様々な形状と大きさの  $\alpha\beta$ 型のタンパク質構造の設計図を描き、これら設計図を基にして計算機でタンパク質構造のデザインを行った。デザインしたタンパク質のアミノ酸配列を大腸菌に組み込み発現・精製を行い、実験的にその立体構造を決定したところ、デザインした構造は非常に高い精度で実験構造と一致しており(下図)、本研究で確立した様々な形状と大きさのタンパク質構造をデザインする手法の有用性を示した。

### 計算機でデザインした構造(上段)と実験(NMR)により決定した構造(下段)の比較

#### 計算機モデル



#### NMR



#### 研究テーマ B 「小分子結合:リン酸結合タンパク質のデザイン」

自然界には分子モーターや Ras 等において、ヌクレオチド結合・加水分解に伴う構造変化に重要とされる P-loop motif(GXXXXGT/S)が存在する。この P-loop motif と研究テーマ A で構築したデザイン手法を用いて、リン酸結合タンパク質のデザインを行った。P-loop motif の ABEGO パターンと、研究テーマ A で発見した ABEGO パターンのルールを用いて  $\alpha\beta$  型タンパク質の主鎖構造設計図を描き、この設計図を基にして計算機でリン酸結合タンパク質のデザインを行った。デザインしたタンパク質のアミノ酸配列を大腸菌に組み込み発現・精製を行い、蛍光偏光法を用いてデザインしたタンパク質のリン酸結合能を調べたところ、mM 程度の親和性でリン酸に結合するタンパク質を得ることに成功した。

### 3. 今後の展開

さきがけ研究を実施することで、アロステリックタンパク質のデザインに向けて、様々な研究の種を蒔くことができた。今後は、更に「小分子結合」に着目して研究を行い、ATP に特異的に結合するタンパク質を創出する。研究テーマ B でデザインした P-loop モチーフを持つ  $\alpha\beta$  型構造に all- $\alpha$  型構造を増築することでマルチドメイン化し、2つのドメイン間に ATP のアデニン環を特異的に認識して結合するポケットを持つタンパク質のデザインを行っている。加えて、ATP 結合時にこれらドメイン間で「構造変化」を生み出すことのできるタンパク質のデザインも計画している。研究期間内では、「多量体形成」についての研究を実施することはできなかったが、将来的には現在デザインしている ATP 結合タンパク質を多量体化させることにより、ATP 結合に伴う構造変化により多量体形成を制御するアロステリックタンパク質の創出を目指す。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
(研究者)

2014年より、さきがけ研究者として採用されると共に、分子科学研究所においてタンパク質分子をデザインする研究室をスタートさせた。残念ながら3年の研究期間内では、アロステリックタンパク質の創出までには至らなかったが、本研究を遂行することで、タンパク質分子を計算機および生化学実験両方を用いてデザインするための研究環境の整備はもちろんのこと、今後どのように研究を展開していくか、その骨となるコンセプトと研究の土台を作り上げることができた。社会・経済への波及効果に関しては、望みのタンパク質分子デザインするための技術の確立に大きな一歩を踏み出すことができたと考えており、今後デザインしたタンパク質分子による細胞の機能・設計や医療および産業への貢献、さらには新規酵素やマテリアル開発による産業へ貢献できると考えている。

## (2) 研究総括評価

### (研究総括)

タンパク質の主鎖二面角を5つの領域に分割し、タンパク質の3次元立体構造を主鎖二面角パターンとして捉えることで、タンパク質の二次構造をつなぐループの形状に、いくつかのパターンがあることを発見した。さらに、局所および非局所構造に関するルールを用いることで様々な形状や大きさを持つ $\alpha/\beta$ 型タンパク質構造の様々なデザインに成功した。このルールとATP結合・加水分解に関わるP-loopモチーフを組み合わせることで、リン酸に結合するタンパク質のデザインに成功したことは高く評価できる。タンパク質分子を自在にデザインする手法を広めて、細胞の制御・設計の基礎分野から、新規素材の開発、新規医薬品など広い産業分野で貢献すること期待したい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. #Yu-Ru Lin, #\*Nobuyasu Koga, Rie Tatsumi-Koga, Gaohua Liu, Amanda F. Clouser, Gaetano T. Montelione, \*David Baker ( # Yu-Ru Lin and Nobuyasu Koga contributed equally. ) Control over overall shape and size in de novo designed proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**(40), E5478-5485, 2015

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 著作物

1. 古賀理恵, 古賀信康, 「計算機でゼロからタンパク質をデザイン - 望みのタンパク質分子のテーラーメイド創出を目指して」, *化学*, **71**, 42-46, 2016年3月