

ゼロからの新規タンパク質デザイン

古賀 信康 大阪大学 蛋白質研究所 (IPR) 教授
 生命創成探究センター 生命分子創成グループ 教授 (兼務)
 分子科学研究所 協奏分子システム研究センター 教授 (兼務)



2006年、神戸大学・自然科学研究科にて博士号 (理学) 取得。同年、神戸大学・理学部・特別研究員。
 2007年、京都大学・理学研究科・特別研究員。
 2007年7月より、ワシントン大学・生化学科・日本学術振興会海外特別研究員。
 2009年7月より、ワシントン大学・生化学科・特別研究員。
 2014年4月より、分子科学研究所・協奏分子システム研究センター・准教授。
 2018年4月より、生命創成探究センター・生命分子創成グループ・准教授を経て、2022年10月より現職。

タンパク質分子は、ほどけた紐のような状態からアミノ酸配列に指定された立体構造に折り畳むことで機能を発揮しています。また、タンパク質の配列空間は天文学的に広いです。例えば100残基のタンパク質のアミノ酸配列パターンの総数は 20^{100} ($\sim 10^{130}$) 通り考えることができますが、地球上に存在する1,000万の生物種が、それぞれ10万種類の遺伝子を持つとしたときのアミノ酸配列パターンの総数は 10^{12} 通りしかなく、前述の 10^{130} 通りは圧倒的に大きい数と理解することができます。古賀グループでは、この広大な配列空間の中から、新規タンパク質を創り出すための合理設計手法を開発してきました。特に、

主鎖を含めてゼロからタンパク質を創り出すこと、もうひとつは自然界のタンパク質を改造することの2つのアプローチで研究を行ってきました。紙面の都合上、本稿では前者に絞って記します。

整合する局所および非局所相互作用に関するデザインルール

自然界のタンパク質構造を観察すると、タンパク質が発現する機能は、複雑で多様なタンパク質構造が生み出していることがわかります。そのため私達の望む機能を持つタンパク質を創るためには、タンパク質構造を自在に設計する技術の構築が重要となります。ノーベル賞をとったAnfinsen

は「タンパク質は自由エネルギー最小に対応する立体構造に折りたたまむ」というタンパク質熱力学原理を提唱しました (Anfinsen, C. B. *Science* **181**, 223-230, 1973)。これをタンパク質折り畳み第1原理とすると、郷は第2原理である整合性原理を提唱しました (Go, N. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183-210, 1983)。これは「折り畳み後のタンパク質構造は、自由エネルギー最小であるに加えて、アミノ酸配列上近い残基間に働く局所相互作用と、遠い残基間に働く非局所相互作用が、矛盾なく天然構造を安定化するように設計されている」というものです。私達は、この原理を満たすようなタンパク質を設計するためには、どうすれば良いか

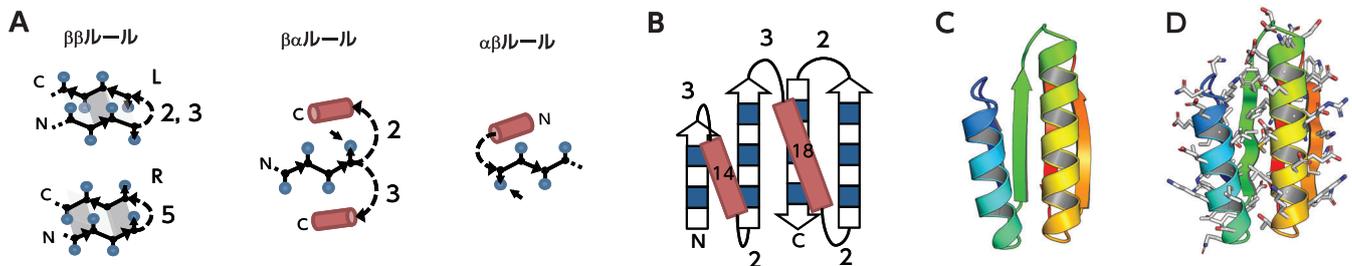


図1 デザインルールを用いた構造設計。

A) 整合する局所および非局所構造に関するデザインルール。B) 主鎖構造設計図:N, CはN, C末端、四角はストランド残基、細長い長方形はヘリックス、曲線はループを表す。赤の四角はヘリックス、白と青の四角はストランド、黒はループを示す。数字はルールで決めたヘリックスとループの長さを表す。青の四角は側鎖が紙面手前に、白の四角は側鎖が紙面奥にあることを示す。C) 設計図を基に構築された主鎖構造。D) 設計されたタンパク質構造。Cで設計された主鎖構造をもとに、これを安定にするような側鎖構造を構築する。

と考え研究を進め、その結果、整合する局所および非局所構造に関するデザインルールを発見しました (図1A) [1]。このデザインルールは、連続する2次構造が形成する非局所構造と辻褃の合う局所主鎖構造 (α ヘリックスや β ストランドの長さおよびループの長さや形状) を記述するものです。一般的に、タンパク質がどのような立体構造に折り畳むのかは、アミノ酸配列、言い換えると側鎖の並びに着目されがちです。しかし、これらのルールは、タンパク質がどのような構造に折り畳むのかは、側鎖 (アミノ酸配列) の詳細というよりも、局所主鎖構造が重要であることを意味しています。私達は、これらデザインルールを使って、様々な $\alpha\beta$ 型

タンパク質の主鎖構造設計図を描き (図1B)、この設計図をもとに主鎖構造を構築し (図1C)、この主鎖構造を安定にするような側鎖構造を設計したところ (図1D)、4本 β ストランドからなる様々なトポロジー (2次構造の3次元空間上の配置と、ループによるこれら2次構造のつなぎ方) の $\alpha\beta$ 型タンパク質構造について原子レベルの正確さで主鎖を含めてゼロから構造を設計することに成功しました (図2) (Koga, N. et al. *Nature* **491**, 222-227, 2012; Lin, Y.-R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E5478-E5485, 2015)。

疎水性コアがほぼバリンでも折りたたみ超安定なデザインタンパク質

興味深いことに、我々がデザインしたタンパク質は自然界のタンパク質とは異なって、殆どのが100°Cでも変性しない超安定な構造を形成していました (図2)。そこで、なぜこれら人工設計タンパク質が極めて高い安定性を示すのかその理由に迫りました [2]。タンパク質構造の安定性は、

タンパク質構造内部の様々な疎水性アミノ酸残基によるジグソーパズルのように密な側鎖パッキングが重要であることが、これまでの多くの研究で示されています。実際、私達がタンパク質を人工設計する際にも、このような密な疎水性側鎖パッキングを持つようにタンパク質を設計していました。しかしながら一方で、私達が発見したデザインルールは、様々な疎水性アミノ酸残基による疎水性パッキングというよりも局所主鎖構造の重要性を示唆しています。そこで、タンパク質構造内部の疎水性アミノ酸残基の大半をサイズの小さい残基 (バリン) に置換し、疎水性パッキングをゆるめたときに、折り畳みおよび安定性がどのように変化するのかを調べました。驚いたことに、疎水性アミノ酸の88%がバリンになるよう置換した人工設計タンパク質でも、設計した構造への折り畳み能を示し、加えて変性温度が100°C以上の高い熱安定性を持つことが判明しました (図3)。すなわち、デザインタンパク質の高い熱安定性は、疎水性アミノ酸残基によるパッキングというよりも、ルールを用いて設計した主鎖構造に起因することが本研究により示されました。

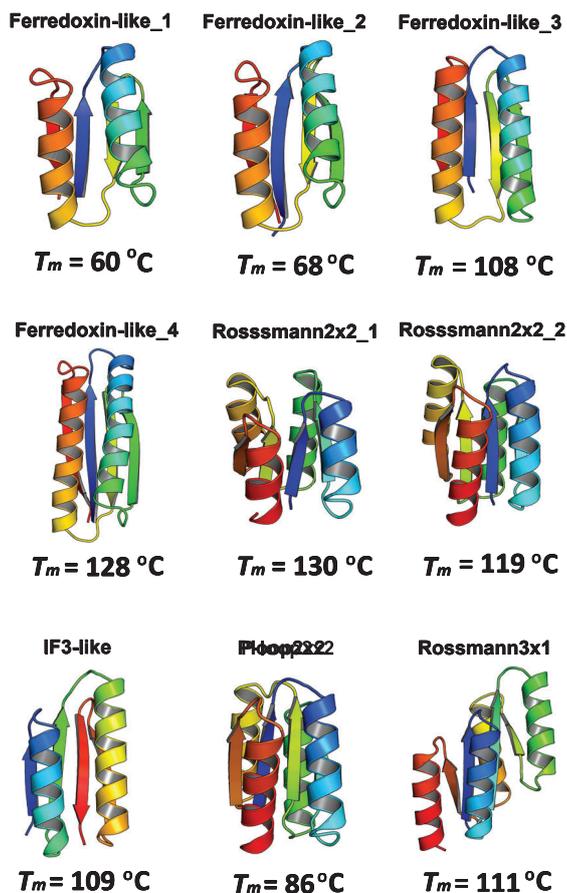


図2 ゼロからデザインした様々な $\alpha\beta$ 型タンパク質。デザインしたタンパク質の名前、計算機構造、安定性 (変性温度 T_m) を示す。変性温度は、室温から170°Cまで温度を上昇させながら円偏光二色性を測定し求めた。

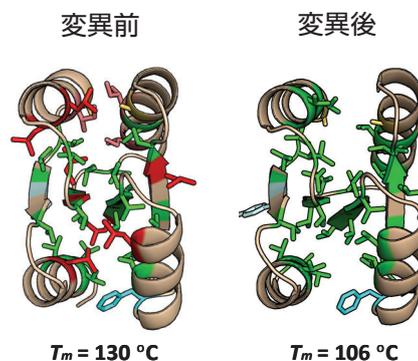


図3 構造内部の疎水性パッキングを壊しても超安定に折りたたむデザインタンパク質。赤、ピンク、緑の残基それぞれ、ロイシン、イソロイシン、バリンを示す。デザインルールを用いて設計したタンパク質 (左) はロイシンとイソロイシンを全てバリンに変異させても、折り畳み能を示し超安定であった (右)。

設計図通りに折り畳まない

デザインタンパク質

次に私達は、デザインルールがより大きく複雑なタンパク質構造のデザインにも適用できるか、5本および6本のβストランドからなる100残基以上のサイズのαβ型タンパク質構造の人工設計に挑戦しました^[3]。しかし、実験で決定された構造は、計算機で設計した構造と異なり、内部のストランドの並びが入れ替わったトポロジーに折り畳んでいました(図4A)。なぜ、デザインしたトポロジーに折り畳まないのか、この問題を解決するために様々な仮説を立て研究を行ったところ、

デザインルールを用いて作成した設計図をもとに構築したタンパク質は、数個の連続する2次構造において整合性原理を満たしていても、全体構造という観点から整合性原理を満たしておらず主鎖構造の歪みが生じているのではないかという仮説にたどりつきました。そこでこの仮説をもとに、折り畳みシミュレーションを行ったところ、デザインに用いた設計図は、ストランドの並びが入れ替わったトポロジーの実験構造から復元した設計図と比べて、「βシート形成度」および「両末端ヘリックス間のパッキング度」が低いことを明らかにしました(図4B)。さら

に、ストランドの長さを短くすることや、βストランド間の相対的な位置を調整することで、主鎖構造の歪みを抑えながら、βシート形成および両末端ヘリックス間のパッキング度合いを高められることを明らかにしました(図4C)。次に私達は、これらの発見を基に「βシート形成度」および「両末端ヘリックス間パッキング度」が高くなるような、主鎖構造歪みの低い主鎖構造設計図を描き、これら設計図を基にタンパク質を設計したところ、5本および6本ストランドからなる大きく複雑なαβ型タンパク質のデザインに成功しました(図3D)。

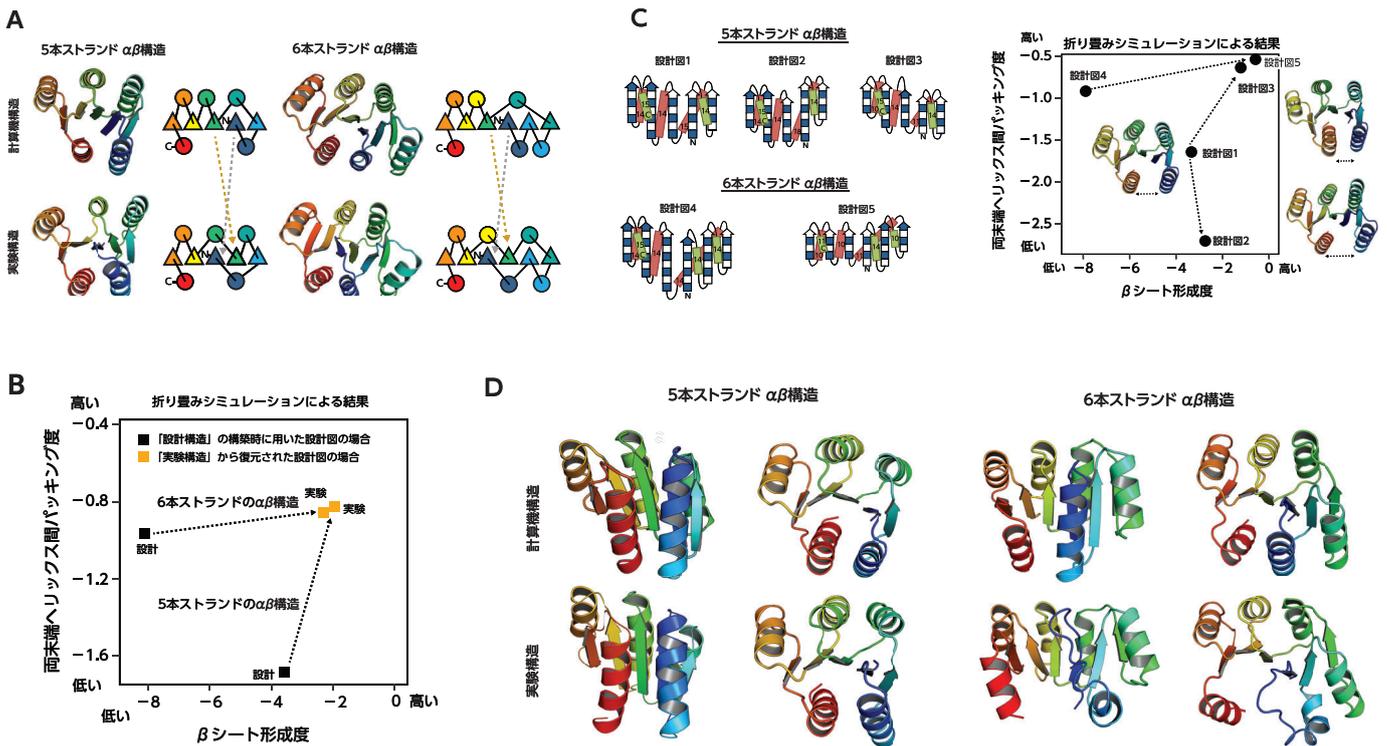


図4 5本および6本ストランドからなるαβ型タンパク質構造のデザイン。

A. 構造の右隣の絵に、βストランドおよびαヘリックスの3次元的な配置および、それらがどのようにループで連結されているのかを模式的に示した。N, Cはアミノ酸配列のN, C末端を表し、三角はβストランド、丸はαヘリックス、直線はループを表す。計算機で設計した構造と比べて、実験構造では青と緑のストランドの位置が入れ替わっていることがわかる。B. 折り畳みシミュレーションで明らかにした主鎖構造歪み。設計構造を構築するために用いた設計図と、実験構造から復元した設計図をもとに折り畳みシミュレーションを行ったときの、「βシート形成度」と「両末端ヘリックス間パッキング度」を示す。右上にいくほど、主鎖構造の歪み無く、βシートと両末端ヘリックス間パッキングが形成されることを表す。C. 5本および6本ストランドのαβ型タンパク質の様々な主鎖構造設計図と、βシート形成度および両末端ヘリックス間パッキング度の関係。ストランドの長さが短いほどβシート形成度が高くなる(設計図4から5の変化に対応)。また、βストランド間の相対的な位置を変えることで、βシートの曲率が変わり、両末端ヘリックス間距離が変わり、ヘリックス間のパッキング度が変化する(設計図1から2の変化に対応、または1から3の変化に対応)。D. C.の設計図3と設計図5を用いて、デザインした5本および6本ストランドのαβ型タンパク質。計算機構造(上)と実験構造(下)。

自然界で未発見のタンパク質トポロジー

さらに私達は、自然界で発見されていない新規トポロジーについての研究を行いました^[4]。タンパク質構造は年間1万個以上のペースで決定され続け、現在では20万個以上の構造が蛋白質構造データベース (PDB) に登録されています。しかしながら近年、トポロジーという観点からは、新規トポロジーが発見されることは極めて稀であることが知られています。そこで、自然界は物理化学的に折り畳み可能なトポロジーを全て探索し尽くしたのか、それとも自然が探索していないトポロジーはまだ多数存在しているのかについて研究を行いました。まず、物理化学的に折り畳み可能なトポロジーを見

分けるルールを考え、これらを用いて現在のPDBには存在しないが物理化学的には折り畳み可能と考えられる4本ストランドからなるβシートを持つαβ型トポロジーを8種類予測しました。続いて、これら予測したトポロジーを持つタンパク質を実際にデザインできるかどうか調べました。その結果、私達はこれら全ての新規トポロジーを持つタンパク質のデザインに成功しました (図5)。この結果は、物理化学的に折り畳み可能なトポロジーを見分けるルールの妥当性を示しています。そこで、5-8本ストランドからなるβシートを持つ新規αβ型トポロジーを予測したところ、約1万個もの新規トポロジーが存在することが予測されました。

自然界に存在するαβ型トポロジーは約400個程度であることを踏まえると、自然界は物理化学的に折り畳み可能なトポロジーの殆どを発見しておらず、未踏の広大なタンパク質構造空間が存在することを本研究は示唆しています。

まとめ

これまでに新規タンパク質を創り出すための合理設計手法を開発し、広大な配列空間を探索することで、自然界に存在しない構造およびトポロジーを持つタンパク質をデザインしてきました。本稿ではαβ型タンパク質のデザインについて紹介しましたが、All-α型タンパク質のデザイン^[5]やこれらを用いたタンパク質の動的機能の制御^[6]にも成功しています。今後は、特定の構造に折り畳むだけでなく、機能するタンパク質の創出に挑戦したいと考えています。

謝辞

上記の研究は、研究を主体的に進めたグループのメンバーはもちろんのこと、研究を直接または間接的にサポートしたグループのメンバー、共同研究者の皆様方、さらには分子科学研究所の皆様方のおかげで実現することができました。ここに深く感謝いたします。

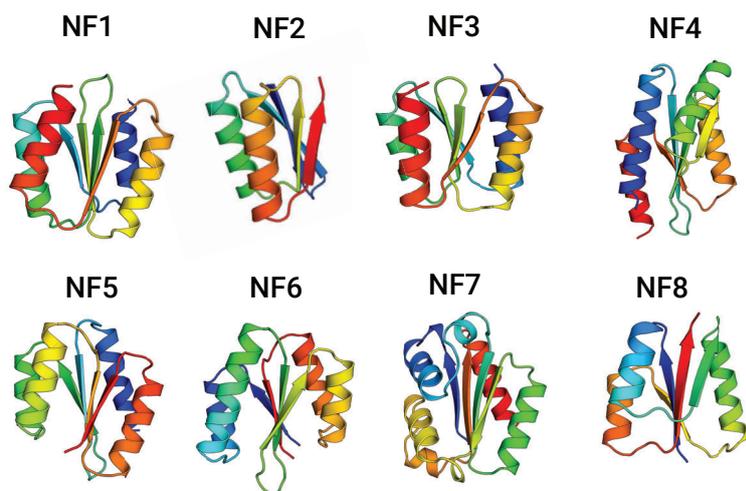


図5 新規トポロジーを持つ8個のデザインしたタンパク質。

参考文献

- [1] R. Koga, N. Koga, Consistency principle for protein design, *Biophys. Physicobiol.*, **16**, 304-309 (2019).
- [2] R. Koga, M. Yamamoto, T. Kosugi, N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Fujiwara, N. Koga, Robust folding of a de novo designed ideal protein even with most of the core mutated to valine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 31149-31156 (2020).
- [3] N. Koga, R. Koga, G. Liu, J. Castellanos, G. T. Montelione, D. Baker, Role of backbone strain in de novo design of complex α/β protein structures, *Nat. Commun.*, **12**, 3921 (2021).
- [4] S. Minami, N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Nagashima, T. Fujiwara, R. Koga, G. Chikenji, N. Koga, Exploration of novel αβ-protein folds through de novo design, doi: 10.1101/2021.08.06.455475, *bioRxiv* (2021).
- [5] K. Sakuma, N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Nagashima, T. Fujiwara, K. Suzuki, N. Kobayashi, T. Murata, T. Kosugi, R. Koga, N. Koga, Design of complicated all-α protein structures, doi: 10.1101/2021.07.14.449347, *bioRxiv* (2021).
- [6] M. Mitsumoto, K. Sugaya, K. Kazama, R. Nakano, T. Kosugi, Takeshi Murata, Nobuyasu Koga, State-targeting stabilization of adenosine A2A receptor by fusing a custom-made de novo designed α-helical protein, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12906 (2021).