古賀 信 康 (准教授) (2014 年 4 月 1 日着任)

A-1) 専門領域：生物物理学, タンパク質分子デザイン

A-2) 研究課題：

a) 計算機および生化学的アプローチによるタンパク質分子デザイン

A-3) 研究活動の概略と主な成果

望みの機能を持ったタンパク質分子を自在にデザインすることが可能になれば、細胞の制御・設計や医療への貢献、加えて新規酵素やマテリアル開発による産業への応用が期待される。我々は、タンパク質分子を主鎖構造からデザインすること、更には自然界のタンパク質分子を大きく改造することにより、望みのタンパク質分子を創製する理論と技術の開発を行った。

- a) $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のゼロからのデザイン；これまでに2次構造パターンやループの長さといった局所主鎖構造が3次構造トポロジーの決定に重要であることを発見し、それらの関係性を3つのルールとして体系化している。これまでに、これらのルールを用いることで100残基以下の様々なトポロジーと形状の $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザインに成功してきた。今年度は、これらのルールがより大きなサイズのタンパク質をデザインする際においても有効であるかどうか検証するため、100残基以上の大きさのタンパク質構造のデザインに取り組んだ。その結果、これら3つのルールのみでは不十分であり、ルールを用いて描いた主鎖構造設計図と、実際に主鎖構造を組み立てたときの3次構造の整合性を考慮する必要があることが明らかになった。これらを考慮して計算機でデザインしたタンパク質を大腸菌に組み込み発現・精製し、生化学実験によって折り畳み能を調べたところ、デザインしたタンパク質は安定な構造を形成していた。さらに、NMRにより構造を決定したところ、計算機上で構築したデザインモデルと一致していた。
- b) α ヘリカルタンパク質構造のゼロからのデザイン；複数の α ヘリックスが集まった α ヘリカル構造は、極めて多様な構造を生み出すことができ、加えてそれらの構造は柔軟であるため、 α ヘリカル構造は機能発現に重要な役割を果たす。そこで様々な α ヘリカル構造を自在にデザインするための手法の開発を行った。自然界のタンパク質構造を解析することで、ヘリックス同士をつなぐループに典型的なループパターンが存在することを明らかにした。次に、これらのループパターンを組み合わせることで多様な形状の α ヘリカル構造の構築に成功した。これまでに、一つの形状の α ヘリカル構造について、デザインしたタンパク質の折り畳み能を生化学実験により調べたところ、デザインしたタンパク質は安定な構造を形成していた。現在はこのデザインのX線およびNMRによる構造解析、さらには他の形状を持つ α ヘリカル構造のデザインを行なっている。
- c) 折り畳みに必須なアミノ酸の種類探索；自然界のタンパク質は20種類のアミノ酸からなる。タンパク質が自発的に特定の構造に折り畳むためには、これら20種類のアミノ酸全てが必要なのかどうか明らかにすることを目的として、タンパク質の疎水性コアパッキングに重要とされるILEおよびLEUを全く含まないタンパク質分子のデザインを行った。デザインしたタンパク質の折り畳み能を生化学実験により調べたところ、デザイン配列は安定な構造を形成していた。これらの研究結果は、タンパク質の折り畳みには20種類のアミノ酸が必ずしも必要ではないことを示すものである。現在は、NMRによりこの変異体の構造決定を行っている。
- d) ATP結合タンパク質のゼロからのデザイン；自然界にはATPを加水分解して動的機能を発現するタンパク質が存在する。タンパク質がATPを加水分解するためのミニマムな装置を明らかにすることを目的とし、まずATPを結合す

るタンパク質のゼロからのデザインを行った。これまでに発見した3つのルールとヌクレオチド結合に重要とされる P-loop モチーフを用いることで、計算機上で ATP 結合タンパク質のデザインを行った。続いて、生化学実験によりデザインタンパク質の ATP 結合親和性の測定を行ったが、ATP に対して高い結合親和性を示さなかった。現在は、高い ATP 結合親和性を示すタンパク質のデザインに向けて、様々な方面から研究を行っている。

- e) 自然界のタンパク質構造を改造して創るヘム結合タンパク質：ヘムを例としてこれに結合するタンパク質をデザインすることで、望みの小分子に結合するタンパク質分子をデザインする手法の開発を行った。自然界のタンパク質をベースとして、その構造に大きなポケットを持つように改造することで、計算機デザインを行い、生化学実験によりデザインタンパク質のヘム結合能を調べたところ、ヘムに結合していることが明らかになった。
- f) 動的機能を発現する自然界のタンパク質 F-ATPase および V-ATPase の改造：自然界には、ATP 加水分解のエネルギーを利用して構造変化することで機能を発現するタンパク質が存在する。このようなタンパク質がどのようにして動的機能を発現しているのか、進化の結果により生み出された自然界のタンパク質である F-ATPase および V-ATPase を改造することにより、そのメカニズムに迫った。

B-1) 学術論文

V. SWAMINATHAN, J. M. KALAPPURAKKAL, S. B. MEHTA, P. NORDENFELT, T. I. MOORE, N. KOGA, D. BAKER, R. OLDENBOURG, T. TANI, S. MAYOR, T. A. SPRINGER and *C. M. WATERMAN, “Actin Retrograde Flow Actively Aligns and Orients Ligand-Engaged Integrins in Focal Adhesions,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 10648–10653 (2017).

Y.-R. LIN, N. KOGA, S. M. VOROBIEV and D. BAKER, “Cyclic Oligomer Design with De Novo $\alpha\beta$ -Proteins,” *Protein Sci.* **26**, 2187–2194 (2017).

P. NORDENFELT, T. MOORE, S. MEHTA, J. KALAPPURAKKAL, V. S. SWAMINATHAN, N. KOGA, T. LAMBERT, D. BAKER, J. WATERS, R. OLDENBOURG, T. TANI, S. MAYOR, C. M. WATERMAN and T. SPRINGER, “Direction of Actin Flow Dictates Integrin LFA-1 Orientation during Leukocyte Migration,” *Nat. Commun.* **8**, 2047 (16 pages) (2017).

B-4) 招待講演

古賀信康, 「分子をデザインする」, 市民公開講座第 111 回分子科学フォーラム・特別編, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 2017年2月.

古賀信康, 「Rational design of protein molecules from structure to function」, 第 17 回日本蛋白質科学会ワークショップ「細胞内外で機能する人工蛋白質のボトムアップデザイン」, 仙台国際センター, 仙台, 2017年6月.

古賀信康, 「タンパク質分子の構造から機能の合理設計」, 神戸大学先端融合科学シンポジウム「非共有結合系の分子科学：構造と機能」, 神戸大学理学部, 神戸, 2017年7月.

古賀信康, 「ゼロからのタンパク質分子構造デザイン」, 第7回合成生物工学シンポジウム, 神戸大学百年記念館六甲ホール, 神戸, 2017年8月.

古賀信康, 「主鎖から合理設計するタンパク質分子」, 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻, 第 10 回 ChemBio ハイブリッドレクチャー, 東京大学武田ホール, 東京, 2017年9月.

古賀信康, 「ゼロからのタンパク質分子構造デザイン」, 「細胞を創る研究会」10.0 シンポジウムセッション(ほほま) ゼロから創る人工細胞, 京都教育文化センター, 京都, 2017年10月.

古賀信康,「タンパク質分子の合理デザイン」,JST-CRDS ライフサイエンス・臨床医学分野生命工学区分俯瞰ワークショップ:多階層研究の統合が拓くデザインバイオ〜予測に基づく生命分子・システムの設計に向けて〜,市ヶ谷カンファレンスセンター,東京・2017年10月.

小杉貴洋,“Design of ATP Binding Site from Scratch and in V1-ATPase,”第17回日本蛋白質科学会年会,仙台国際センター,仙台,2017年6月.

B-6) 受賞,表彰

古賀信康,第13回日本蛋白質科学会年会若手奨励賞(2013).

古賀信康,第51回日本生物物理学会年会若手奨励賞(2013).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本生物物理学会平成27-29年度分野別専門委員:タンパク質設計・ドラッグデザイン(2015-2017).

その他

第48回若手ペプチド夏の勉強会(大学セミナーハウス(八王子))講師(2016.7.31-8.2).

第56回生物物理若手の会夏の学校(支笏湖ユースホステル(千歳市))講師(2016.9.4).

創価大学大学院工学研究科勉強会(創価大学大学院(東京八王子市))講師(2017.6.30).

B-10) 競争的資金

自然科学研究機構アストロバイオロジーセンタープロジェクト研究,「地球上に存在しないトポロジーを持つタンパク質分子の合理設計」,古賀信康(2017年-2018年).

自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンターオリオン公募研究,「創って理解するモータータンパク質の動作原理」,古賀信康(2016年-2019年).

内閣府革新的研究開発推進プログラム(ImPACT),「タンパク質構造の合理的安定化手法の開発:βグルコシダーゼの耐熱化」,古賀信康(2017年-2019年).

科研費若手研究(A),「改造して理解するモータータンパク質F₁-ATPaseの動作原理」,古賀信康(2015年-2019年).

科学技術振興機構ささかけ研究,「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」,古賀信康(2014年-2017年).

日本学術振興会海外特別研究員,「タンパク質分子構造の理論研究:構造変化する機能性タンパク質のデザイン」,古賀信康(2007年-2009年).

C) 研究活動の課題と展望

今年度は総勢10名で活動を行なった。それぞれのメンバーが計算および実験手法に習熟してきており,研究結果を出すことに集中出来ている。研究は,タンパク質デザインと自然界のタンパク質構造の改造の2本柱で展開しており,それぞれ順調に結果が出始めている。今後の課題は,タンパク質デザイン手法を洗練させることで計算機デザインをより高速化する必要がある。