

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完全にゼロ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改造することで、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う。

- a) $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザイン；これまでに2次構造パターンと3次構造モチーフの整合性に関するルールを発見し、これらのルールを用いることで100残基以下の様々な形状の $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザインに成功してきた。これらのルールがより大きなサイズのタンパク質デザインにも適用可能かどうか検証するため、100残基以上のサイズのタンパク質構造のデザインに取り組んだ。その結果、これらルールに加えて、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全体構造との整合性、すなわち、2次構造パターン-3次構造モチーフ-全体構造の間の整合性が重要であることを明らかにした。これらを考慮して5本ストランドの $\alpha\beta$ 型タンパク質を新たにデザインし、大腸菌に組み込み発現・精製し、生化学実験により折り畳み能を調べたところ、デザインは安定な構造を形成し、NMRにより決定された構造は、計算機モデルとよく一致していた。現在は、6本ストランドの $\alpha\beta$ 型タンパク質をデザインすることで、発見したデザイン原理の有効性を検証中である。
- 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、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。まず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、計算機上で多様な形状の α ヘリカル構造の構築に成功した。計算機でデザインした3つの異なる形状の α ヘリカルタンパク質について、折り畳み能を生化学実験により調べたところ、これら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構造解析を行ったところ、計算機モデルはNMR構造とよく一致していた。今後は、多様な α ヘリカル構造を用いることで、機能性タンパク質のデザインを行う。
- c) 折り畳みに必須なアミノ酸の種類の探索；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、疎水性コア残基がVALのみからなる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、NMRにより立体構造を解析したところ、デザインは変性温度が100℃以上の安定な立体構造を形成していた。本研究成果は、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ないことを示すものである。
- 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、b) でデザインした α ヘリカル構造を用いるなど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計算機デザインで改造し、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。その結果、デザインはヘムに結合していることが明らかになった。現在は、結合の親和性を向上させるべく再設計を行っている。
- 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、回転モータータンパク質である F-ATPase および V-ATPase を改造することで、そのメカニズムに迫った。分子動力学シミュレーション、1分子観測、結晶構造解析等あらゆる手法を駆使して、構造変化のメカニズムに迫ったところ、F-ATPase の構造変化に重要な部位を特定し、V-ATPase の動的機能発現における非触媒部位のアロステリックな役割を明らかにした。
- g) 自然界に存在しないトポロジーのデザイン：簡単な理論計算では考えることができるが、自然界には現存しないトポロジーが多数あることが示唆されている。本研究では、自然界に現存しない新規トポロジーを持つタンパク質分子を創ることで、新規トポロジーは物理化学的に立体構造形成することが困難なために存在していないのか、それとも偶然生物が見つけないだけなのか、これらの謎に迫る。これまでに、網羅的なタンパク質立体構造データベース検索を行い、いくつかの新規トポロジーの同定に成功した。現在は、これら新規トポロジーの計算機デザイン及び生化学実験による折りたたみ能の検証を行っている。
- h) タンパク質構造の合理安定化法の開発：タンパク質の耐熱性を向上させることは、タンパク質を産業利用する上で重要である。タンパク質をゼロからデザインする技術を応用して、自然界のタンパク質を合理的に安定化する手法の開発を行った。開発した手法を用いて、バイオマス糖化に重要な β グルコシダーゼおよび創薬ターゲットの一つである GPCR の耐熱化を行っている。

B-4) 招待講演

古賀信康, 「De novo protein design & Application to design thermostable proteins, International Symposium on “Artificial Cell Reactor Science & Technology”」, 東京大学伊藤謝恩ホール, 東京, 2018年4月.

古賀信康, 「生命現象を生み出す分子「タンパク質」をゼロから創る」, 生命創成探究センター開所記念講演会, 岡崎, 2018年5月.

古賀信康, 「整合性原理のまわりをぐるぐると, 理論生物物理研究会～理論生物物理の今後を考える～」, 京都大学大学院理学研究科, 京都, 2018年6月.

古賀信康, 「設計図通りに折りたたまないデザインタンパク質」, 第18回蛋白質科学会年会ワークショップ「拡大する蛋白質の世界：Anfinsen のドグマを超えて」, 新潟朱鷺メッセ, 新潟, 2018年6月.

古賀信康,「Toward generation of de novo designed protein structure library」, 生命創成探究センター Frontier Bio-Organization Forum, 岡崎, 2018年7月.

古賀信康,「Explore vast sequence space by de novo design」, ImPACT 野地プログラムセミナー, 東京大学工学部, 東京, 2018年9月.

古賀信康,「タンパク質の合理設計:ゼロからの創成と天然物の改造」, 生命創成探究センター第1回シンポジウム, 岡崎, 2018年10月.

古賀信康,「合理デザインで拓く新規タンパク質配列空間」, 169委員会第57研究会, 東京大学大学院農学生命科学研究科フードサイエンス棟中島薫一郎記念ホール, 東京, 2018年10月.

古賀信康,「DBTL in protein design, Trends in Computational Molecular Biology」, 石川四高記念文化交流館, 金沢, 2018年11月.

古賀信康,「超安定な理想タンパク質の合理設計と天然タンパク質の累積的耐熱化」, Biothermology Workshop, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 2018年12月.

T. KOSUGI, “Rational Design of ATP Binding Site to Understand Rotary Molecular Motor,” Okazaki Conference, Okazaki (Japan), 2018年9月.

T. KOSUGI, “Rational Design of ATP Binding Site; An Attempt to Understand Molecular Motor,” 第56回日本生物物理学会「創って知る生物物理:生命現象の再構成と理解」, 岡山, 2018年9月.

小杉貴洋,「V₁-ATPaseの非触媒界面にATP結合部位を作ることでその役割を明らかにする」, 第8回分子モーター討論会, 東京, 2018年11月.

B-5) 特許出願

特願 2018-172810 (2018/10/18),「耐熱性βグルコシダーゼ」, 古賀信康(自然科学研究機構), 2018年.

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).

古賀信康, 分子科学研究奨励森野基金 (2018).

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・ドッキングデザイン (2015-2018).

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).

第111回分子科学フォーラム特別編「分子をデザインする」講師 (2017.2.3).

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-8) 大学での講義, 客員

京都大学理学部,「化学特別講義2」,2018年12月10日-12日.

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-2019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(2018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ひけ研究,「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).

自然科学研究機構若手研究者による分野間連携研究プロジェクト,「世界最小蛍光タンパク質の創生——計算機科学と生体イメージングを繋ぐ——」,小杉貴洋(2018年-2019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。いくつかのテーマについては,成果をまとめる時期に来ている。課題は前年度と同様,①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こと,②デザインしたタンパク質の折りたたみ能および機能発現能を,大量かつ高速に検証する生化学実験手法を構築すること,である。