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)　αβ 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 αβ 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 αβ 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 αβ 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 18 種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典型的な全てのループパターンを網羅した５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。これまでに，そのうちの３つに対して 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。また，これら５つの異なる形状のデザインとは別に，計算機で長さ 70 残基，形状約 800 種類，配列約 8000 種類もの大量のデザイン配列を作り出すことに成功した。今後は，これら大量のデザイン配列を折りたたみ能や機能でスクリーニングする。

c)　デザインタンパク質の安定化機構の解明；デザインしたタンパク質の多くは，100 °C でも変性しないという極めて興味深い特性を有する。この異常に高い安定性は，タンパク質の主鎖を局所的に制限することによって探索すべき構造空間を小さくしたことに起因するのか，あるいは，疎水性コアパッキングのような非局所相互作用によるものなのかを，疎水性コアの Leu, Ile を Val に変えてパッキングを損なうことにより調べた。その結果，全部で 10 残基の Leu，Ile を Val に変えても，タンパク質は同じトポロジーへと折りたたみ，かつ，まだ 100 °C 以上の安定性を示した

ことから，タンパク質の主鎖を望みのトポロジーに折りたたみやすいように制限することがデザインタンパク質の極度な安定性を生み出していることが示唆された。

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，b) でデザインした α ヘリカル構造を融合してアデニン環結合部位を作ることにより，高い ATP 結合親和性を示すタンパク質設計に取り組んでいる。

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出していないだけなのか，これらの謎に迫る。網羅的なタンパク質立体構造データベース検索を行い，８つの新規トポロジーを同定した。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。そこで，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。とりわけ，８つのうちの１つのトポロジーは，両端を引っ張ったときに結び目を形成するという極めて特異な構造であり，折りたたみが難しそうな自然界に現存しない新規トポロジーを持つタンパク質をも人工的に創り出すことに成功したという事実は，これら８つの新規トポロジーは偶然生物が見つけ出せなかった，あるいは，進化の過程で淘汰されたということを示唆している。

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 PET 製品のバイオリサイクルに重要な PET 分解酵素の耐熱化を行っている。また，デザインタンパク質が極めて安定であることを利用して，デザインタンパク質そのものを融合する手法を使って創薬ターゲットの一つである GPCR の耐熱化も行っている。

B-1) 学術論文

S. BASAK, R. P. NOBREGA, D. TAVELLA, L. M. DEVEAU, N. KOGA, R. TATSUMI-KOGA, D. BAKER, F. MASSI and C. R. MATTHEWS, "Networks of Electrostatic and Hydrophobic Interactions Modulate the Complex Folding Free Energy Surface of a Designed βα Protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 6806–6811 (2019).

H. MURAKOSHI, H. HORIUCHI, T. KOSUGI, M. ONDA, A. SATO, N. KOGA and J. NABEKURA, "ShadowR: A Novel Chromoprotein with Reduced Non-Specific Binding and Improved Expression in Living Cells," *Sci. Rep.* **9**, 12072 (11 pages) (2019).

B-3) 総説，著書

R. KOGA and N. KOGA, "Consistency principle for protein design," *Biophys. Physicobiol.* **16**, 304–309 (2019).

小杉貴洋，古賀理恵，古賀信康,「合理デザインによる新規タンパク質の創出：現状とその可能性」, *実験医学*, 羊土社, **37(18)**, 11月号, 3089–3095 (2019).

B-4) 招待講演

古賀信康,「タンパク質構造の合理的耐熱化法の開発」, ImPACT 野地プログラム最終成果報告会——人工細胞リアクタが拓くイノベーション——, 東京, 2019年3月.

古賀信康,「タンパク質分子の合理設計：ゼロからの創成と天然物の改造」, 酵素工学研究会第81回講演会, 京都大学北部総合教育研究棟益川ホール, 京都, 2019年4月.

古賀信康,「Generation of de novo designed protein structure library」, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄, 2019年7月.

古賀信康,「合理的設計による新規タンパク質配列空間の探索」, 理化学研究所, 横浜, 2019年7月.

古賀信康,「人工タンパク質構造ライブラリーの創出」, 第71回日本生物工学会大会シンポジウム「タンパク質工学におけるドライーウエット技術融合の新展開」, 岡山, 2019年9月.

古賀信康,「De novo design protein structure library」, 金沢大学ナノ生命科学研究所, 金沢, 2019年11月.

T. KOSUGI, "Design of Allosteric Site to Regulate Rotary Molecular Motor V_1-ATPase," Frontier Bioorganization Forum 2019, KIAS, Soul (Korea), 2019年7月.

T. KOSUGI, "Allosteric Regulation of V_1-ATPase by Designing Walker Motif in Non-catalytic Interface," The 2nd Tokyo ATPase Workshop, 東京大学, 東京, 2019年9月.

S. MINAMI, "Design of new fold proteins yet-unexplored in nature," 分子研研究会「New Frontier in Protein Design & Engineering」, Okazaki, 2019年3月.

N. KOBAYASHI, "Cumulative thermostabilization of β-glucosidase with structure-based sequence profile information," 分子研研究会「New Frontier in Protein Design & Engineering」, Okazaki, 2019年3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).

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・ドラッグデザイン (2015–2019).

学会の組織委員等

分子研研究会「New Frontier in Protein Design & Engineering」（岡崎）オーガナイザー，座長 (2019.3.15).

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).

第 114 回国研セミナー「合理設計で探索する広大なタンパク質配列空間」（岡崎市立小豆坂小学校）講師 (2019.7.30).

情報機構「タンパク質のデザイン技術——現状と今後の展望」（東京）講師 (2019.9.13).

B-8) 大学での講義，客員

東京医科歯科大学,「大学院特別講義」, 2019 年 6 月 21 日.

京都大学理学部, 客員准教授,「化学特別講義２」, 2019 年 12 月 9 日–11 日.

名古屋大学工学部,「応用物理学特論」,「応用物理学特別講義」, 2019 年 12 月 16 日–18 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 F_1-ATPase の動作原理」, 古賀信康 (2015 年 –2019 年).

科学技術振興機構さきがけ研究,「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).

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９名で活動を行なった。前年度からの課題として，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，に今年度も取り組んできた。結果として①について，ある程度手法を確立することができた。今後は②について，より注力していきたい。