

古賀 信 康 (准教授) (2014 年 4 月 1 日着任)

小杉 貴洋 (助教)
古賀 理恵 (特任研究員)
南 慎太郎 (特任研究員)
小林 直也 (特任研究員)
近藤 未菜子 (特別協力研究員)
三本 齊也 (大学院生)
海田 新悟 (大学院生)
鈴木 博子 (事務支援員)

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、5本あるいは6本ストランドから成る100残基以上のサイズの $\alpha\beta$ 型タンパク質構造のデザインに取り組んだ。しかし、NMRにより決定された構造では、内部のストランドの順番が入れ替わってしまっていた。計算機モデルとNMRによる実験構造を比較・解析することにより、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。これらを考慮して新たにデザインし、NMRにより構造を決定したところ、設計した通りのストランドの並びを有しており、発見したデザイン原理の有効性が示された。
- 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、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、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。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℃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部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℃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。生化学実験により、デザインしたタンパク質は安定な構造を形成し、ATPに対して800 μ Mくらいの結合親和性を示した。今後は、結晶化して構造を解くことにより、ATPが設計した通りに結合しているのかを確認する。
- e) ヘム結合タンパク質のデザイン；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。これまで自然界のタンパク質構造を改造してヘム結合タンパク質をデザインしようと試みてきたが、設計した通りに結合しなかった。現在は、b)でデザインした α ヘリカル構造を融合してヘム結合部位を作ることにより、設計通りにヘムを結合するタンパク質のデザインに取り組んでいる。
- 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。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ないで、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、PET製品のバイオリサイクルに重要なPET分解酵素、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。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GPCRの耐熱化も行っている。

B-1) 学術論文

T. KOSUGI, T. IIDA, M. TANABE, R. IINO and N. KOGA, “De Novo Design of Allosteric Control into Rotary Motor V_1 -ATPase by Restoring Lost Function,” *bioRxiv* 2020.09.09.288571 (2020). doi: 10.1101/2020.09.09.288571

R. KOGA, M. YAMAMOTO, T. KOSUGI, N. KOBAYASHI, T. SUGIKI, T. FUJIWARA and N. KOGA, “Robust Folding of a De Novo Designed Ideal Protein Even with Most of the Core Mutated to Valine,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 31149–31156 (2020). doi: 10.1073/pnas.2002120117

B-3) 総説, 著書

古賀理恵, 古賀信康, 「整合性原理に基づくタンパク質デザイン」, *生物物理* **60(6)**, 325–330 (2020). doi: 10.2142/biophys.60.325

B-4) 招待講演

古賀信康, 「Exploration of novel protein folds by de novo design」, 2020 World Conference on Protein Science 「Physics of Protein Evolution」, 2020年7月. (中止)

古賀信康, 「Exploration of novel protein folds by de novo design」, 第58回日本生物物理学会年会シンポジウム 「Biomolecular Design to Control their Functions」, オンライン開催, 2020年9月.

古賀信康, 「合理設計によるタンパク質配列空間の探索: NMRによる構造決定はその羅針盤」, 蛋白研セミナー 「生体系NMR法の最前線 基礎から学ぶ最新NMR解析法——構造解析の自動化」, オンライン開催, 2020年11月.

古賀信康, 「De novo design of novel protein structures」, Molecular Engine International Mini-workshop 「Molecular Engine in Virtual or Real World?」, オンライン開催, 2021年3月.

小杉貴洋, 「失われた機能を復活させて回転分子モーターをアロステリック制御する」, 第10回分子モーター討論会, オンライン開催, 2021年11月.

B-5) 特許出願

特開 2020-43777(P2020-43777A), 「耐熱性 β グルコシダーゼ」, 古賀信康, 小林直也, 南慎太郎(自然科学研究機構), 2020年.

B-6) 受賞, 表彰

小林直也, 井上研究奨励賞 (2020).

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- 令和 2 年度分野別専門委員：タンパク質設計・ドラッグデザイン (2015-2020).

その他

第 7 回森野ディスカッション Zoom 開催協力 (2020.8.31).

B-10) 競争的資金

科研費新学術領域研究, 「生体発動分子の創成：自然界の生体分子の改造とゼロからの設計」研究計画班 (代表：古田健也), 古賀信康, 小杉貴洋 (研究分担者) (2018 年-2023 年).

科研費基盤研究 (B), 「物理的に設計可能な蛋白質フォールド空間の解明：理論と実験的検証」 (代表：千見寺浄慈), 古賀信康 (研究分担者) (2019 年-2022 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, 「全身性代謝制御機構解明のための *in vivo* 微量必須栄養素イメージング法の開発」 (代表：中島健一朗), 古賀信康 (連携研究者) (2018 年-2021 年).

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-2020 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).

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).

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きがけ研究, 「タンパク質複合体を合理的に改造し, 細胞内機能を理解・制御する」, 小杉貴洋 (2020 年-2024 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-2021 年).

自然科学研究機構 ExCELLS 若手奨励研究, 「二つのドメインからなるヘム結合タンパク質の合理設計」, 小杉貴洋 (2020 年-2021 年).

自然科学研究機構 ExCELLS 若手奨励研究, 「自然界のタンパク質構造を再設計することでヘム結合タンパク質を合理的に設計する」, 小杉貴洋 (2018 年-2019 年).

C) 研究活動の課題と展望

これまでの研究活動により様々な形状のタンパク質構造を設計する技術の開発に成功した。今後は, 機能するタンパク質の設計に向けて, これらの技術を用いて設計したタンパク質を, ビルディングブロックとして組み合わせ, より巨大かつ複雑な形状のタンパク質を設計する技術開発に取り組む。また, 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ついても取り組む。