

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) 回転対称多量体タンパク質のデザイン；多くのタンパク質は3次構造を形成した後に4次構造を形成することで機能を発現する。これまでにデザイン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ることで，多様な形状の新規回転対称多量体をデザインする技術を開発する。これまでに開発した技術を用いてデザインしたタンパク質のひとつが，6量体を形成していることを示唆する結果を得ている。
- c) ヘム結合タンパク質のデザイン；これまでにデザイン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う。特に，ヘム結合タンパク質を例として研究を行っている。これまでにデザインしたタンパク質を，3量体のコイルドコイルを形成する α ヘリックスのNC末端それぞれに連結させることで，連結したドメイン間に小分子結合サイトが形成されるか計算機シミュレーションを行い調べている。
- 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。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) 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た。また、V-ATPase の非触媒活性部位に、ヌクレオチド結合サイトを設計することで、V-ATPase に新規アロステリック機構を付与し、V-ATPase の回転を加速することに成功した。
- f) 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、重要な創薬ターゲットである GPCR のうちアデノシン A_{2A} 受容体について、状態選択的に安定化することに成功した。また、PET 製品のバイオリサイクルに重要な PET 分解酵素の安定化に成功した。
- g) α ヘリカルタンパク質構造のゼロからのデザイン: 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し、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 18 種を明らかにした。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。これらのうち5つの異なる形状の α ヘリカルタンパク質をデザインしたところ、NMR で決定された構造は計算機モデルとよく一致していた。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 300 種類、配列 7350 種類の大量のデザイン配列を作り出した。
- h) 自然界に存在しないトポロジーのデザイン: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を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、これらの謎に迫った。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。次に、これら新規トポロジーを持つタンパク質のデザインを行ったところ、8個全てのトポロジーについてデザインに成功した。これらの結果は、8個の新規トポロジーは偶然生物が見つけ出していなかったことを示す。

B-1) 学術論文

N. KOGA, R. KOGA, G. LIU, J. CASTELLANOS, G. T. MONTELLIONE and D. BAKER, “Role of Backbone Strain in De Novo Design of Complex α/β Protein Structures,” *Nat. Commun.* **12(1)**, 3921 (12 pages) (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-24050-7

A. NAKAMURA, N. KOBAYASHI, N. KOGA and R. IINO, “Positive Charge Introduction on the Surface of Thermostabilized PET Hydrolase Facilitates PET Binding and Degradation,” *ACS Catal.* **11(14)**, 8550–8564 (2021). DOI: 10.1021/acscatal.1c01204

K. SAKUMA, N. KOBAYASHI, T. SUGIKI, T. NAGASHIMA, T. FUJIWARA, K. SUZUKI, N. KOBAYASHI, T. MURATA, T. KOSUGI, R. KOGA and N. KOGA, “Design of Complicated All- α Protein Structures,” *bioRxiv* 2021.07.14.449347 (2021). DOI: 10.1101/2021.07.14.449347

S. MINAMI, N. KOBAYASHI, T. SUGIKI, T. NAGASHIMA, T. FUJIWARA, R. KOGA, G. CHIKENJI and N. KOGA, “Exploration of Novel $\alpha\beta$ -Protein Folds through De Novo Design,” *bioRxiv* 2021.08.06.455475 (2021). DOI: 10.1101/2021.08.06.455475

H. MURATA, H. IMAKAWA, N. KOGA and G. CHIKENJI, “The Register Shift Rules for $\beta\alpha\beta$ -Motifs for De Novo Protein Design,” *PloS One* **16(8)**, e0256895 (24 pages) (2021). DOI: 10.1371/journal.pone.0256895

M. MITSUMOTO, K. SUGAYA, K. KAZAMA, R. NAKANO, T. KOSUGI, T. MURATA and N. KOGA, “State-Targeting Stabilization of Adenosine A_{2A} Receptor by Fusing a Custom-Made De Novo Designed α -Helical Protein,” *Int. J. Mol. Sci.* **22(23)**, 12906 (13 pages) (2021). DOI: 10.3390/ijms222312906

B-3) 総説, 著書

古賀理恵, 古賀信康, 「タンパク質の合理設計技術開発」, *化学と工業*, **74(8)**, 576–587 (2021).

B-4) 招待講演

古賀信康, 「合理設計による新規タンパク質配列空間の探索」, Cell Biology Center Colloquium, 東京工業大学, オンライン開催, 2021年10月.

古賀信康, 「Exploration of novel protein structures by de novo design」, OIST Mini Symposium “New Protein by Evolution and Engineering,” オンライン開催, 2021年11月.

古賀信康, 「自然に観測されないトポロジーを持つタンパク質の人工設計」, 第4回ExCELLSシンポジウム, オンライン開催, 2021年12月.

古賀信康, 「整合性原理と新規タンパク質デザイン」, 自然科学研究機構計算科学研究センタースーパーコンピュータワークショップ2021「生体分子の構造・機能・デザインの計算科学」, オンライン開催, 2022年1月.

古賀信康, 「創って理解する 生命現象をつかさどる分子「タンパク質」」, 第33回自然科学研究機構シンポジウム「宇宙と、分子と、私たち」, オンライン開催, 2022年3月.

B-6) 受賞, 表彰

小杉貴洋, 日本蛋白質科学会若手奨励賞優秀賞 (2021).

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 (2015–2022).

学会誌編集委員

生物物理学会誌2022年度編集委員 (2022–).

B-8) 大学での講義, 客員

東京大学大学院, 集中講義「タンパク質分子の基礎から合理設計まで」, 2021年10月25日-26日.

B-9) 学位授与

三本齊也, 「State-selective stabilization of adenosine A2A receptor by de novo design of protein structures」, 2022年3月, 博士(理学).

B-10) 競争的資金

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, 「人工設計タンパク質を多量体化することでヘム結合部位を創る」, 小杉貴洋 (2021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, 「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).

自然科学研究機構若手研究者による分野間連携研究プロジェクト, 「タンパク質機能制御技術を用いた細胞生物学の創出」, 小杉貴洋 (2021年-2022年).

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: 中島健一郎), 古賀信康 (連携研究者) (2018年-2021年).

B-11) 産学連携

キリンホールディングス(株), 「PET 分解酵素の開発」, 古賀信康, 飯野亮太, 中村彰彦 (2022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, これらの技術を用いて機能タンパク質を設計するとともに, 設計したタンパク質構造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。