

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14660

研究課題名（和文）構造と機能の両立を目指した新規ヘム結合蛋白質の計算設計と実験的検証

研究課題名（英文）Computational design and experimental validation of a novel heme-binding protein with desired structure and function

研究代表者

森脇 由隆（Moriwaki, Yoshitaka）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教

研究者番号：70751303

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当研究は計算科学を用いて蛋白質の構造と機能を創出するためのデザイン理論の探索と実証を目指すものである。その実践の例として、特に「ヘム輸送機能を持つ蛋白質のデザイン」を達成することを目標とした。統計解析によってヘム結合に必要なヘム結合部位周辺の蛋白質立体構造情報を取得し、それらを構造パーツとして同定した後、Topobuilderと呼ばれる蛋白質構造ビルドソフトウェアを用いて機能モチーフを安定な新規蛋白質構造ドメインの創出に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんどすべての生物は蛋白質を利用し自身の生命活動を維持している。その蛋白質の機能はそれぞれ固有の立体構造に起因している事が多いため、人工的に指定した蛋白質の構造をとるようなアミノ酸配列を合理的に設定できるようになることは、創薬を含むあらゆる生命活動を人工的に制御できるようになることが予想される。

研究成果の概要（英文）：This research aims to explore and demonstrate design theories for creating protein structures and functions using computational science. We also aimed to achieve the design of a de novo protein with a heme-transfer functionality. After obtaining protein 3D structural information around the heme-binding site necessary for heme-binding by statistical analysis and identifying them as structural parts, we used a protein structure-building software called "Topobuilder" to create new protein structural backbones with the functional motifs.

研究分野：生物学・生物物理学・生化学

キーワード：蛋白質科学 計算科学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生体中で固有の立体構造を持ち、様々な化学反応を起こす場として機能する重要な役割を有している。蛋白質の立体構造と機能は構成するアミノ酸配列に一对一対応しており、ある決まった機能性蛋白質をコードするアミノ酸一次配列を与えれば、自動的に 1 つの立体構造を取るよう折りたたまれることがよく知られている。しかし反対に、望ましい蛋白質立体構造を持たせるためにはどのような配列が必要か、という問題は長らく解答困難とされてきた。ところが、2010 年代以降、David Baker 博士らと彼らが開発するソフトウェア“Rosetta”がこの問題を解くための知見を多く発表し始めた。彼らは、天然に存在しない人工蛋白質の構造を Rosetta でデザインし、その構造を取ると予測されたアミノ酸配列を実験的に合成し、それが正しく設計通りに折りたたまれたことを構造解析で求めることに複数例成功している。このように、アミノ酸配列からの蛋白質構造予測および創出の分野は大きく進歩しつつあるといえる。

## 2. 研究の目的

蛋白質は生体中で固有の立体構造を持ち、様々な化学反応を起こす場として機能する重要な役割を有している。蛋白質の立体構造と機能は構成するアミノ酸配列に一对一対応しており、ある決まった機能性蛋白質をコードするアミノ酸一次配列を与えれば、自動的に 1 つの立体構造を取るよう折りたたまれることがよく知られている。しかし反対に、望ましい蛋白質立体構造を持たせるためにはどのような配列が必要か、という問題は長らく解答困難とされてきた。ところが、2010 年代以降、David Baker 博士らと彼らが開発するソフトウェア“Rosetta”がこの問題を解くための知見を多く発表し始めた。彼らは、天然に存在しない人工蛋白質の構造を Rosetta でデザインし、その構造を取ると予測されたアミノ酸配列を実験的に合成し、それが正しく設計通りに折りたたまれたことを構造解析で求めることに複数例成功している。このように、アミノ酸配列からの蛋白質構造予測および創出の分野は大きく進歩しつつあるといえる。

## 3. 研究の方法

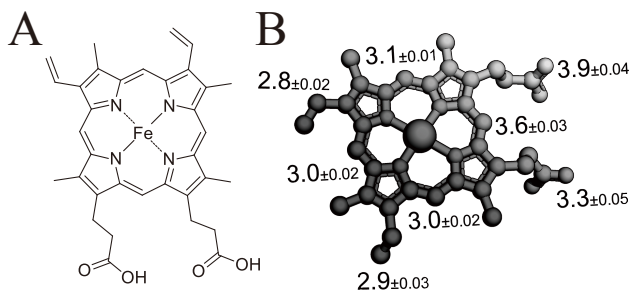
蛋白質は生体中で固有の立体構造を持ち、様々な化学反応を起こす場として機能する重要な役割を有している。蛋白質の立体構造と機能は構成するアミノ酸配列に一对一対応しており、ある決まった機能性蛋白質をコードするアミノ酸一次配列を与えれば、自動的に 1 つの立体構造を取るよう折りたたまれることがよく知られている。しかし反対に、望ましい蛋白質立体構造を持たせるためにはどのような配列が必要か、という問題は長らく解答困難とされてきた。ところが、2010 年代以降、David Baker 博士らと彼らが開発するソフトウェア“Rosetta”がこの問題を解くための知見を多く発表し始めた。彼らは、天然に存在しない人工蛋白質の構造を Rosetta でデザインし、その構造を取ると予測されたアミノ酸配列を実験的に合成し、それが正しく設計通りに折りたたまれたことを構造解析で求めることに複数例成功している。このように、アミノ酸配列からの蛋白質構造予測および創出の分野は大きく進歩しつつあるといえる。

## 4. 研究成果

ヘム b 分子は中心に鉄原子を持ち、疎水性が高く平面なポルフィリン環部分と親水的なプロピオン酸基を 2 つ持つ。その形状から線対称な分子として考慮されることもあるヘムだが、PDB の構造情報を用いた予備調査ではヘムのプロピオン酸基周辺の残基配置には非対称性が存在していることが判明している (Fig. 1B)。また、ポルフィリン環はほぼ例外なく疎水性残基または  $\pi$ - $\pi$  相互作用を利用した芳香族アミノ酸で覆われている。これらの統計情報をもとにまず活性部位を構築した。

研究目的の例として挙げたヘム結合

輸送能を持つタンパク質をタンパク質構造データベース PDB から探索したところ、immunoglobulin-like な構造ドメインを持つ  $\beta$  シートリッチなタンパク質 Isd-NEAT ドメイン (代表構造 PDB: 206P, Pfam ID: PF05031) の他に、3-Layer(aba) Sandwich の構造ドメインを持つ



**Fig. 1.** (A) ヘムの構造式 (B) ヘム b 周囲の結合部位の minimum inaccessible radius [Å] マップ。値が小さいほどその原子が蛋白質の残基に覆われていることを表す。算出方法は *ghecom* の定義を利用した。

ChaN タンパク質 (PDB: 2G5G, Pfam ID: PF04187) が見つかった。興味深いことに、これらはともにチロシン残基 1 つのみでヘムの鉄原子と配位結合しており、5 配位型 High-spin であることが各タンパク質についての分光学的な解析から判明している。さらに私の解析からチロシン残基が同時にヘムの鉄原子に配位した 6 配位状態は準安定的であり、どちらか片方のチロシン残基の 5 配位型へと移行しやすいことが判明したことから、これら 2 つのタンパク質結晶構造において 6 配位めが空位になっていることは、ヘム輸送機能を達成するためであることが強く示唆されている。この配位形式は多くのヘム結合タンパク質の構造上の特徴と機能、すなわち鉄原子上で酸化還元反応や化学反応を触媒するために構成されたものと大きく異なる。他の多くのヘム結合タンパク質では反応場を形成するためにヘムの結合部位がそのヘム結合蛋白質の奥深くに結合していることが多く、また使用するアミノ酸もヒスチジン・メチオニン残基が大多数を占めている。

これらのヘム結合部位周辺の 5.0 オングストロームの残基を新規ヘム輸送のパーツとして取得した。この後、Topobuilder を用いて目的とする構造部位を持つタンパク質の構造骨格を取得した。得られた構造ドメインは Immunoglobulin-like、 $\beta$  バレル構造が多い傾向が見られた。ヘム結合部位周辺を形成後、全体骨格を形成するフェイズにおいては 2G5G のような  $\alpha$  ヘリックスリッチなドメイン構造を意識的に用い、天然に存在しない  $\alpha + \beta$  構造によるヘム結合・輸送タンパク質の形成を目指した。現在、これらの構造を選別中であり、安定性を MD シミュレーションによって評価している。

将来的には完成した構造を持つタンパク質を形成するアミノ酸配列を大腸菌発現系で発現させ、目的とするヘム結合機能・輸送能を検証することを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|