

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03166

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Elucidating the physically designable protein fold space: theory and experimental validation

研究代表者

千見寺 浄慈 (George, Chikenji)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：10420366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,790,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質のフォールドの種類はおよそ1000種類ほどしかないということが広く受け入れられているが、なぜこのように限られた数しかないのだろうか？また、このうち何パーセントくらいを人類は既に知っていて、新規フォールドはどれくらい残されているのだろうか？この問題を解決するため、デザインしやすいフォールドの条件を判定する理論を開発した。この理論の妥当性を検証するため、理論によって予測された新規フォールドを実験的に合成し、構造決定を行ったところ、完全に理論の予測通りの結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、与えられたタンパク質の構造がデザインしやすいのか否かを判定する基準が存在しなかった。このような状況でタンパク質デザインを行うことは、方程式の解が存在するか否かわからないまま方程式を解こうとすることに相当する。本研究では、タンパク質の構造がデザインしやすいか否かを判定する理論を世界で初めて開発することに成功し、この問題を解決した。また、未だ生物進化が発見していないが物理的に設計可能なタンパク質フォールドの数を見積もったところ、少なくとも既知のフォールドの数十倍はあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is widely accepted that there are only about 1000 different protein folds.

Why is there such a limited number? Also, what percentage of these are already known to mankind, and how many novel folds are left? To address these questions, a theory was developed to determine the conditions for highly designable folds. To test the validity of this theory, novel folds predicted by the theory were experimentally synthesised and their structures were determined. The results were completely in line with the theory's predictions.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質 合理的デザイン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の合理的設計(合理的デザイン)とは、まず目標とするタンパク質立体構造を人間が指定し、次にその構造に自発的に折り畳むようなアミノ酸配列を物理の法則に従って探すことである。合理設計の研究の意義は、タンパク質の配列と構造の関係を構造予測とは逆の視点から眺めることができること、そして、全く新しい人工的な分子を創造し工学的に役立てることができる、という二つの側面がある。

近年、タンパク質の合理設計の研究が凄まじい勢いで進展している。合理設計の研究は、1997年の Mayo らによるジンクフィンガーモチーフ構造をもつタンパク質の合理設計の成功(Dahiyat & Mayo, Science 1997)に始まるが、これ以降、新規フォールドタンパク質(Kuhlman et al. Science 2003)、蛍光タンパク質(Dou et al. Nature 2018)など、数十例の合理設計の成功報告例がある。本研究課題分担者の古賀も、自然界にはない理想的な形状を持つタンパク質の合理設計に成功しており(Koga et al. Nature 2013)世界をリードしてきた。このようにタンパク質の合理設計のテクノロジーが飛躍的に向上したため、Science 誌の2016年のブレイクスルー・オブ・ザ・イヤーの一つにタンパク質の合理設計が選ばれており、世界的に注目を浴びているテーマの一つである。

タンパク質の合理設計の究極の目標は、「任意の構造に折り畳むアミノ酸配列を自由自在に設計できるようになること」であるが、この観点からすると、これまでの研究では全く手付かずの重要な課題が未解決のまま残されていた。それは、合理設計の最初のステップで人間が目標構造を設定する必要があるが、この際に「どんなフォールドなら物理的に設計可能なのか」を判断する基準がない、ということである。これは言い換えると、「タンパク質の天然構造として存在することができる条件とは何か」という根源的な問題が未解決であるということである。それゆえ、たった一例を除いて、これまでの全ての合理設計の研究では、目標とする構造として(物理的に設計可能であるという保証がある)既知のフォールドが使われてきた。唯一の例外である新規フォールドタンパク質の設計の成功例(Kuhlman et al. Science 2003)では、目標構造が Kuhlman の直感によって選ばれたため、たまたま成功したと言わざるを得ない。研究開始当初では、既知のフォールド以外でどのようなフォールドが設計可能なのかを判断できるガイドラインが存在しなかった。これが、当時としてはタンパク質の合理設計の究極目標到達へのボトルネックになっていた。

2. 研究の目的

本研究で目指すことは、物理的に設計可能なタンパク質フォールドの条件を明らかにすることである。これを達成するための具体的な例題として、本研究では4本ストランドからなるシートタンパク質を対象を限定し、以下の二つを達成することを目的とする。

物理的に設計可能なタンパク質フォールドと不可能なものを判別できる理論を構築する。

物理的に設計可能と予測された新規フォールド「全て」に対し、それを天然構造にもつ人工タンパク質を合理的に設計し、実際に合成・構造決定まで行い、理論の妥当性を批判的に検証する。

3. 研究の方法

本研究方法の概要は、シートタンパク質に対する『物理的に設計可能なフォールドの条件』を以下のような手順で明らかにし、その妥当性を実験的に検証する、というものである。

『物理的に設計可能な条件』の探索

- (1) タンパク質立体構造データベース解析による経験的ルールの発見
- (2) シミュレーションによる経験的ルールの物理的起源の解明(経験則から物理法則へ)
- (3) 物理的に設計可能な(フラストレーションのない)フォールドの特定

新規フォールドの合理設計および実験的検証

- (4) 理論で予測された「物理的に設計可能な新規フォールド」を持つタンパク質の合理設計
- (5) 合理設計によって作られた人工タンパク質の合成・物性評価の実験
- (6) NMR による構造決定

上記の(1)から(6)を多数の標的タンパク質に対して行い、実験と理論を比較する。目標構造通りにならなかった場合、得られた構造から見落とししていた点を学び、理論へフィードバックし、より正しい理論へと改良を行う。

より具体的には方法を以下に記述する。

- (1) タンパク質立体構造データベース解析による経験的ルールの発見

一見よく似て見える構造ペアの中に、これまで誰も気づかなかった経験的ルールを見いだすことができる。例えば、鎖の方向を反転させた関係にあるストランド3本からなるモチーフのペアの例である。これらのペアは、一見するとよく似た構造であるが、データベース中での出現頻度は大きく異なり、片方は物理的に好ましくない可能性を示している。本研究の第一段階では、

このようなペアを網羅的に特定し、タンパク質立体構造の経験則のコレクションを作成する。

(2) シミュレーションによる経験則の物理的起源の解明（経験則から物理法則へ）

第一段階で得られた経験則が物理法則による必然的帰結なのか、あるいは進化による偶然なのかを明らかにするため、得られた経験則が全原子シミュレーションでも再現できるかを検証する。再現できた場合はそのルールの物理的起源を解明する。

(3) 物理的に設計可能な（フラストレーションのない）フォールドの特定

第二段階で得られた複数の物理法則（ルール）を用いると、全てのルールを満たすことができる（フラストレーションがない）フォールドと、満たすことができない（フラストレーションがある）ものがあることがわかる。フラストレーションがないフォールドはデザインビリティが高いのか否かを格子モデルを用いた理論計算による明らかにする。さらに、これらの理論の妥当性を検証するために、フラストレーションのない新規フォールドを特定し、そのようなフォールドをもつ4本 ストランドからなるタンパク質を全て合理設計し、実際に合成・実験および構造決定を行う。

4. 研究成果

タンパク質立体構造のルールを発見するために、我々は シートのレジスターシフトに着目した。

シートのレジスタシフトとは、図1 (A) から (D) に示したように、隣り合う ストランド間の末端のズレを表したものである。レジスターシフトは、シートタンパク質をデノボデザインしようとする際に、設計図として指定する必要がある重要な量であるが、これまで、レジスターシフトに関する研究は全くなかった。我々は、まず、立体構造データベース解析を行い、図1 (E) に示した経験則を発見した。この経験則は、ストランドのズレ方は右上がりであればならない、というものである。

ついで、この経験則が、物理的相互作用の必然的な帰結なのか、あるいは、進化の偶然によるサンプリングバイアスなのかを明らかにするため、この系を模倣したシステムに対し、全原子モデルと網羅的構造探索を用いた計算を行ない、計算結果と経験則を比較した。その結果、経験則と全原子モデルによる計算結果は定量的によく一致した。このことから、ここで得られた経験則は偶然の産物ではなく、物理的相互作用による必然的な帰結であることが示唆された。

さらに、計算結果を詳細に解析することにより、なぜ負のレジスターシフトがデータベースで観測されないのかを検討したところ、主鎖原子間の立体障害と、水素結合不満足によって、負のレジスタシフトはエネルギー的に極めて不安定であることが明らかとなった。以上のことから、我々が発見したレジスタシフトの経験則は、物理的相互作用の帰結であることが証明された。

この結果を踏まえて、過去のデノボデザインの失敗例を眺め直すと、このレジスタシフトのルールを破っている設計図を用いたデノボデザインは、全てその領域のデザインに失敗していたことがわかった。このことから、レジスタシフトルールはデザインの設計図を作成する際に極めて重要な役割を果たすことが示された。

タンパク質立体構造における更なるルール発見に取り組んだ。ここで着目したのは ユニットと ユニットの幾何学的なルールである。具体的には、図2 (A)(B) に示したように、ストランドで定義される面からの ヘリックスの位置に関する経験的なルールをデータベース解析で発見した。これは、ユニットでは ヘリックスの末端と ストランドの末端の位置は同じ位置である傾向が強いのにに対し、ユニットでは ヘリックスの末端の位置が ストランドの末端の右側にくる傾向が強い、というものである（図2 B）。このルールを組み合わせると、同時にルールを満たせるフォールドと、満たせないフォールドがあることがわかった（図2 C-E）。興味深いことに、同時にルールを満たせるフォールドはスーパーフォールドであり、満たせないフォールドは非スーパーフォールドであった。このことから、デザインビリティの高低は、種々の構造のルールを同時に満たせるか、満たせないかで決まっていることが示唆された（図3）。

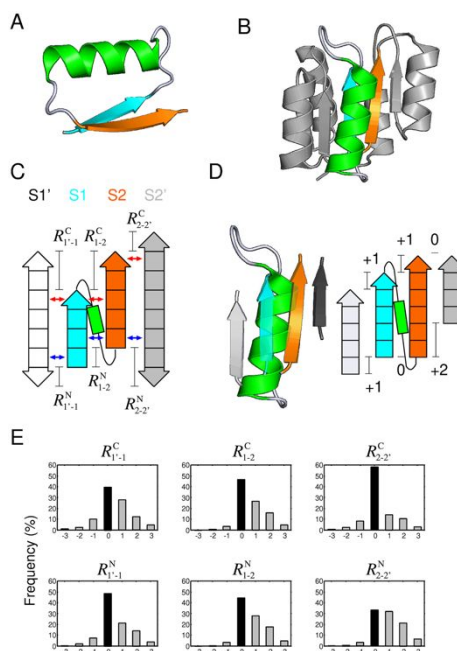


図1： シートのレジスタシフト

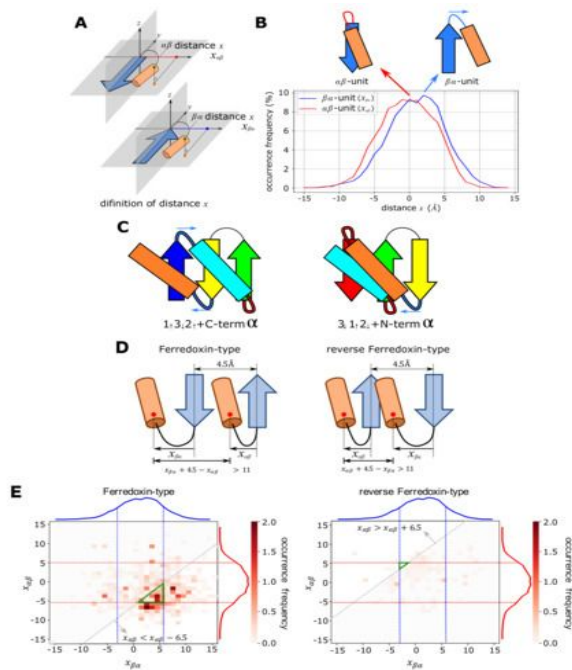


図 2: ユニットと ユニットの経験則とそれから導かれる種々のルール

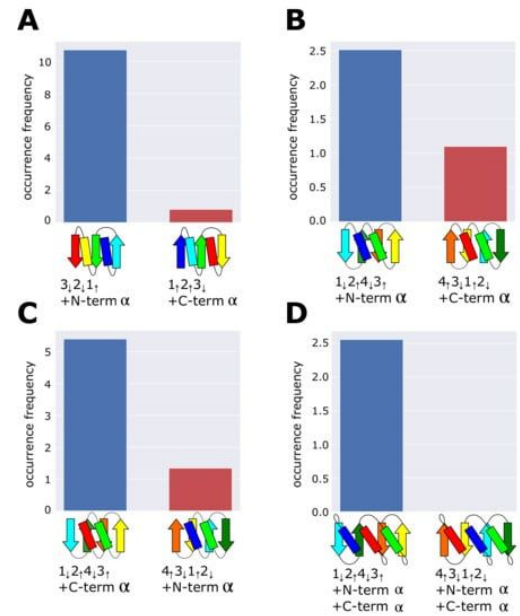


図 3: データベース中でのリバーズ関係にあるトポロジーの出現頻度とフラストレーション

上記の研究の成果から、様々な構造のルールが得られ、また、それらルールを全て同時に満たすことができるフォールドがデザインしやすいフォールドで、同時に満たすことができない（フラストレーションがある）フォールドがデザインしにくいフォールドであることが示唆された。つまりフラストレーションの有無でデザインしやすいか否かを予測できるようになった。この理論を用いて、4本ストランドの全てのフォールドに対してデザインしやすいが、データベースにはないフォールドを特定したところ、図4左のように8個のフォールドが、デザイン可能な新規フォールドであると予測された。この理論および予測の妥当性を検証するために、この8個のフォールドをもつタンパク質を計算機でデザインし、実際にそれらを実験的に合成・測定・およびNMRによる構造決定まで行った。結果として、理論的に予測されたデザイン可能な新規フォールドは、全て目標通りの構造を持つことが明らかとなった（図4右）。以上のことから、我々の開発したデザインしやすさを予測する理論の妥当性が示され、デザインしやすいフォールドとは、フラストレーションのないフォールドであるものであることが証明された。また、この理論を用いて、デザイン可能な新規フォールドの数を見積もったところ、少なくとも、数万種類あることがわかった。このことは、既知のフォールドは進化の過程でたまたま見つかったごくわずかなものであり、未だに生物進化が発見していない有用な機能を持つタンパク質がデノボデザインによって発見される可能性があることを示唆している。

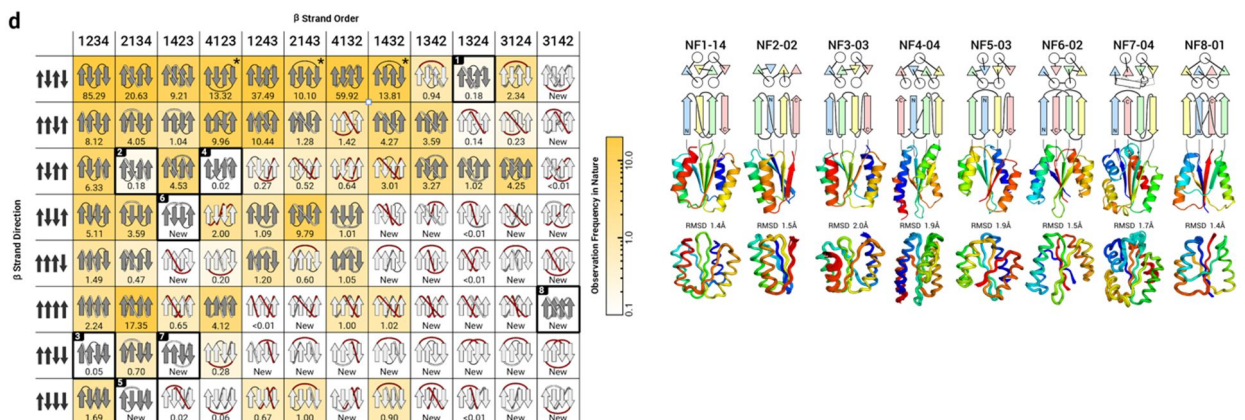


図 4: デザイン可能な新規フォールドの特定と、新規フォールドタンパク質デザインの結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shuntaro Chiba, Masahito Ohue, Anastasiia Gryniukova, Petro Borysko, Sergey Zozulya, Nobuaki Yasuo, Ryunosuke Yoshino, ..., George Chikenji, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 A prospective compound screening contest identified broader inhibitors for Sirtuin 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55069-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Tomoei, Chikenji George, Tokita Kei	4. 巻 104
2. 論文標題 Lattice protein design using Bayesian learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 14404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevE.104.014404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murata Hiroto, Imakawa Hayao, Koga Nobuyasu, Chikenji George	4. 巻 16
2. 論文標題 The register shift rules for -motifs for de novo protein design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0256895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0256895	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishina Takumi, Nakajima Megumi, Sasai Masaki, Chikenji George	4. 巻 27
2. 論文標題 The Structural Rule Distinguishing a Superfold: A Case Study of Ferredoxin Fold and the Reverse Ferredoxin Fold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27113547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Tomoei, Chikenji George, Tokita Kei	4. 巻 2022
2. 論文標題 The cavity method to protein design problem	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment	6. 最初と最後の頁 103403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1742-5468/ac9465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minami Shintaro, Kobayashi Naohiro, Sugiki Toshihiko, Nagashima Toshio, Fujiwara Toshimichi, Koga Rie, Chikenji George, Koga Nobuyasu	4. 巻 -
2. 論文標題 Exploration of novel -protein folds through de novo design	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Megumi Nakajima, George Chikenji
2. 発表標題 Elucidation of local structure contributing to protein stability: Structural features of loop residues of 4-strand -sheet motif
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirotu Murata, George Chikenji
2. 発表標題 Search for Partial Structural Space of Specific Loop Residues by Hydrogen Bond and Steric Repulsion
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuma Toko, George Chikenji
2. 発表標題 The Relationship between Designability of Protein and Preference of Local Structures
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wataru Sagawa, George Chikenji
2. 発表標題 Database Analysis of Protein-protein Interfaces
3. 学会等名 第20回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐川 航, 千見寺 淨慈
2. 発表標題 Database analysis of protein-protein interaction
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田 裕斗, 千見寺 淨慈
2. 発表標題 Search for Partial Structural Space of Specific Loop Residues by Hydrogen Bond and Steric Repulsion
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 床 和真, 千見寺 浄慈
2. 発表標題 The relationship between designability of protein and preference of local structures: A lattice model study
3. 学会等名 第 5 8 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 恵, 千見寺 浄慈
2. 発表標題 Why loops connecting a β -strand and an α -helix prefer particular dihedral angles and amino acids
3. 学会等名 第 5 8 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀信康
2. 発表標題 合理設計による新規タンパク質フォールドの探索
3. 学会等名 第 5 8 回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 千見寺 浄慈
2. 発表標題 物理的にデザイン可能なタンパク質フォールドの条件: 立体構造データベース解析による知識抽出
3. 学会等名 第 1 9 回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田 孝貴、 千見寺 浄慈
2. 発表標題 立体構造データベース中の ループモチーフの出現頻度の偏りの物理的要因
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 裕斗、 千見寺 浄慈
2. 発表標題 機械学習を用いたタンパク質主鎖構造における2面角の再分類
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島 恵、 千見寺 浄慈
2. 発表標題 フレドキシン構造とそのリバース構造のタンパク質デザイナビリティの決定因子
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Ueda, G. Chikenji
2. 発表標題 Relationship between loop geometry and register shift in parallel beta-sheet proteins
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Murata, G. Chikenji
2. 発表標題 Reclassification of dihedral angles in protein backbone structures using machine learning
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Fukuda, G. Chikenji
2. 発表標題 Asymmetry of psi-loop motifs
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Minami, R. Koga, G. Chikenji, T. Sugiki, N. Kobayashi
2. 発表標題 Exploration of novel alpha-beta protein folds by de novo design
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田裕斗, 千見寺浄慈
2. 発表標題 ラマチャンドラプロットの再分類による未知のタンパク質構造の探索
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋智栄, 千見寺浄慈, 時田恵一郎
2. 発表標題 経験ベイズ推定による格子タンパク質模型のデザイン
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Senji Mishima, George Chikenji, Hiroto Murata
2. 発表標題 The register shift rules for β -motifs for de novo protein design: A database analysis and all-atom calculations
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Nishina, George Chikenji
2. 発表標題 Analysis of differences in the number of β -sheet structures that have different β -strand's connections and orientation
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroto Murata, George Chikenji
2. 発表標題 The physical-based criterion for distinguishing superfolds and non-superfolds: the case of pure parallel beta-sheets
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuma Toko, George Chikenji
2. 発表標題 Relationship between designability of proteins and frustration : A lattice model study
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀 信康
2. 発表標題 タンパク質分子の合理設計：天然のタンパク質の改造、ゼロからの創生
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀 信康
2. 発表標題 タンパク質構造の人工設計
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroto Murata, George Chikenji
2. 発表標題 左巻き モチーフをもつタンパク質のデノボデザインに向けて
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Nishina, George Chikenji
2. 発表標題 The structural rule distinguishing a superfold: A case study of ferredoxin fold and the reverse ferredoxin fold
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Senji Mishima, Hiroto Murata, George Chikenji
2. 発表標題 Explaining empirical rules of register shift of -motif by physical interactions
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoki C. Terada, Takumi Nishina, George Chikenji
2. 発表標題 Structural determinants for distinguishing frequently and rarely occurring psi-loop motifs
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Koyama, George Chikenji
2. 発表標題 Analysis of multiple residue interactions in protein complexes
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoei Takahashi, George Chikenji, Kei Tokita
2. 発表標題 Lattice protein design using Bayesian learning
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	古賀 信康 (Koga Nobuyasu) (50432571)	大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・准教授 (82675)	

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
---------	---------