

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04850

研究課題名（和文）タンパク質の動きが連携して機能発現するバイオナノマシンの構築

研究課題名（英文）Construction of bionanomachines in which protein movements cooperate to express functions

研究代表者

山中 優（Yamanaka, Masaru）

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・URA

研究者番号：60632825

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）：研究開始時点で既に構築できていた動きを組み込んだタンパク質超分子（ビルディングブロックタンパク質に、標的分子により2量体から単量体に解離するセンサータンパク質を組み込む）の詳細な挙動解析を行い、組み込んだタンパク質の動きが超分子全体の動きにどう発現するかの知見を得た。また、構造予測ツールAlphaFold2を組み込んだタンパク質超分子構造設計システムの構築を進め、デザイン通りの構造領域シャッフリングした立体構造をとるタンパク質超分子を構築した。研究期間全体を通して、構造領域シャッフリングによるタンパク質超分子のデザインのアクセスビリティと自由度が飛躍的に向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然タンパク質超分子はナノスケールで駆動する分子機械＝ナノマシンとして機能する。最近の深層学習技術により、誰でも自在にタンパク質超分子を設計できるような状況となったが、天然のタンパク質のように複雑に駆動するタンパク質超分子の自在設計には至っていない。本研究の成果は、人工タンパク質超分子に天然タンパク質のようなナノマシンとして複雑に駆動する性質を付与する分子設計の一助となる。

研究成果の概要（英文）：We conducted a detailed analysis of the behavior of protein supramolecules that had already been constructed at the start of the research, which incorporated movements (building block proteins with sensor proteins that dissociate from dimers to monomers by target molecules). We obtained insights into how the movements of the incorporated proteins are expressed in the overall movement of the supramolecule. Furthermore, we advanced the construction of a protein supramolecule structure design system that incorporates the structural prediction tool AlphaFold2, and we constructed protein supramolecules which have the three-dimensional structures with domain shuffling as designed. Throughout the research period, the accessibility and flexibility of designing protein supramolecules through domain shuffling improved dramatically.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ビルディングブロック タンパク質デザイン 構造領域交換 タンパク質超分子

1. 研究開始当初の背景

天然タンパク質の多くは、複数の分子が会合して超分子を形成する。タンパク質超分子は、協同的な基質分子結合、回転・並進運動、環境に応答したシグナル伝達など、ナノスケールで駆動する分子＝ナノマシンとして機能する。天然のタンパク質超分子のように機能するナノマシンを自由自在に構築できれば、医薬、工学のみならず様々な方面での革新が期待できる。近年、タンパク質を素材として、ワイヤー、チューブ、ケージなどの人工的なナノ構造体の構築が報告されており、タンパク質超分子の人工構築法は磨かれつつある。しかしながら、天然のタンパク質超分子のように駆動するタンパク質性人工ナノマシンの構築は、未だ困難である。人工タンパク質超分子に動きを持たせ機能発現させようとする場合、駆動機構を一から構築するのは現状では非常に困難である。そこで、環境変化や標的物質の結合に応答して構造を変えるセンサータンパク質の動作機構を駆動系として超分子に組み込む戦略が有効である。この戦略では、超分子内部の分子間相互作用と駆動機構を如何に両立させるかが課題となる。つまり、超分子化するには分子間に新たに相互作用を導入しなければならないが、これが駆動機構と干渉するとうまく動かしなくなるため、その調整が極めて難しい。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質分子が構造の一部を他の分子と相互交換することにより超分子化する機構であるドメインスワッピングの概念を拡大した独自の分子設計手法構造領域シャッフリングを確立し、センサータンパク質を自在に超分子化させることを目的とした。ドメインスワッピングの本質は相互交換する構造領域とその周辺領域との相補的な構造マッチングであり、分子の同種・異種に関わらず相補的にマッチする構造であれば超分子化するはずである。そこで、立体構造ベースでタンパク質分子を分割し、相対的な位置を改変することで分子間での相補的な構造マッチングを形成、任意の構造・順序・サイズのタンパク質超分子とし構成分子の動きを連携させることで機能発現を試みる。

3. 研究の方法

本研究ではセンサータンパク質を材料とし、ドメインスワッピングを応用した構造領域シャッフリングにより自在に超分子化する。配向を制御した超分子化によりセンサータンパク質に備わる動きを超分子内で連携させ機能発現するバイオナノマシンを構築する。本研究遂行にあたり3つの項目を設定し、段階的に研究を展開する。

【項目1：構造領域シャッフリングの体系化】

網羅的構造解析により、構造領域シャッフリングに必要なタンパク質分子の分割可能位置を決定する体系的基準を定める。これまでに報告されているドメインスワップ構造すべてに対する網羅的データ解析によりドメインスワップ超分子化に必要な構造領域サイズおよび相互作用強度などを導き出す。

【項目2：構造領域シャッフリングによる自在超分子化】

研究項目1で定めた基準を基に、同一タンパク質分子において構造領域シャッフリングを施した構造領域シャッフリングを施した分子種間でのドメインスワッピングにより狙った配向で超分子化させ、タンパク質分子の構造領域の相対的な位置と幾何的方向性を考慮して再配置し構成分子を狙った配向で超分子化するための知見を得る。標的分子の結合により構造変化するセンサータンパク質をベースに、構造領域シャッフリングを行い超分子化を試み、構築した超分子について構造特性や物性を紫外可視吸収、円二色性、多角度光散乱、サイズ排除クロマトグラフィー、電子顕微鏡、原子間力顕微鏡、X線結晶解析を用いて調べる。

【項目3：構成分子の動きが連携した機能発現】

課題2の知見を踏まえ、構成分子同士が動的に連携し機能発現するタンパク質超分子を構築する。センサータンパク質をベースに、動きを連携させるために分子間の相対的な位置と幾何的方向性を考慮した構造領域シャッフリングを施し、超分子を構築する。超分子化で付与した構成分子の相対的な配向により単純な動きが超分子内部で連携することで機能発現させる。

4. 研究成果

項目1について、網羅的構造解析により構造領域シャッフリングの体系化を試みていたが、その最中 Google 傘下の DeepMind 社から深層学習を利用した革新的な構造予測ツール AlphaFold2 が公開されたため、これを組み込んだ形で構造領域シャッフリングタンパク質超分子をデザインする設計システムを構築した。構築した設計システムにより、タンパク質分子を任意の位置・配向で超分子とする設計が可能となった。

項目2について、項目1で構築したシステムを用い、同一タンパク質分子の構造シャッフリング超分子をデザインし、ホモ分子種間でドメインスワッピングして超分子化する分子デザインを行い、各種測定からこれが設計通りの構造となっていることを示した。標的分子の結合により構造変化するセンサータンパク質をベースにした超分子については、既に構築していた ABA (ピ

ルディングブロックタンパク質に CO のセンシングにより 2 量体から単量体に解離するシトクロム *c* の動きを組み込んだ駆動型人工タンパク質超分子)を試料として、各種測定を行った。その結果、ABA ではシトクロム *c* の 2 量体解離を誘発する CO 以外に、イミダゾールでも解離が誘発され、さらに温度条件により会合状態が変化することが明らかとなった。ここから、センサータンパク質を駆動系として組み込んだ超分子において、超分子化によってセンサータンパク質部分の挙動やセンシング、さらに超分子全体の構造安定性等の影響が生じることが示唆され、タンパク質超分子において駆動系の連携を図るうえで、駆動系自体の動きと超分子全体の動きの双方を動的に考慮する必要があると考察した。

項目 3 については、COVID-19 の影響もあり、構成分子の動きを連携させる構造領域シャッフルリング超分子を実際に構築するまでには至っていないが、現在、項目 2 で得た知見を設計システムにフィードバックした分子デザインを試みている段階である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 藤原綱大、真島剛史、小林直也、山中優、米澤健人、上久保裕生、内橋貴之、廣田俊
2 . 発表標題 円順列変異と ヘリックス挿入を用いた 3 ユニット環状ヘムタンパク質の構築と構造解析
3 . 学会等名 第23回日本蛋白質科学会科学会年会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 藤原綱大、龍崎美智子、山中優、真島剛史、小林直也、廣田俊、
2 . 発表標題 シトクロム c 2量体の形成と安定性に対するイオンの影響
3 . 学会等名 日本化学会第104春季年会
4 . 発表年 2024年

1 . 発表者名 Cheng Xie, Hiromitsu Shimoyama, Masaru Yamanaka, Satoshi Nagao, Hirofumi Komori, Naoki Shibata, Yoshiki Higuchi, Yasuteru Shigeta, Shun Hirota
2 . 発表標題 Conversion of a Monomeric Protein into a Domain-swapped Dimer by Utilizing a Tight Hydrogen Bond Network at the Hinge Region for Myoglobin
3 . 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry (国際学会)
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 藤原綱大、大西遥喜、真島剛史、小林直也、山中優、米澤健人、上久保裕生、内橋貴之、廣田俊
2 . 発表標題 循環置換と ヘリックス挿入を用いた 3 ユニット環状ヘムタンパク質の構築と構造解析
3 . 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4 . 発表年 2022年

1．発表者名 藤原綱大、大西遥喜、真島剛史、小林直也、山中優、米澤健人、上久保裕生、内橋貴之、廣田俊
2．発表標題 ヘリックスで連結した3ユニット環状ヘムタンパク質の構築と構造解析
3．学会等名 第48回生体分子科学討論会
4．発表年 2022年

1．発表者名 藤原綱大、山中優、真島剛史、小林直也、大西遥喜、内橋貴之、廣田俊、
2．発表標題 循環置換とヘリックス挿入を用いた3ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築
3．学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4．発表年 2021年

1．発表者名 藤原綱大、大西遥喜、真島剛史、小林直也、山中優、米澤健人、上久保裕生、内橋貴之、廣田俊
2．発表標題 ヘリックスで連結した3ユニット環状ヘムタンパク質の溶液構造の評価
3．学会等名 日本化学会第102春季年会
4．発表年 2021年

1．発表者名 大西遥喜、藤原綱大、真島剛史、小林直也、山中優、緒方英明、廣田俊、
2．発表標題 ヘリックスで連結した3ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築
3．学会等名 日本化学会第102春季年会
4．発表年 2021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	廣田 俊 (Hirota Shun) (90283457)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授 (14603)	
研究 分担者	松尾 貴史 (Matsuo Takashi) (50432521)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授 (14603)	

	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
連携 研究者	小林 直也 (Naoya Kobayashi) (60781945)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	
連携 研究者	真島 剛史 (Tsuyoshi Mahima) (40909131)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

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