

令和元年6月21日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04779

研究課題名(和文)人工タンパク質デザインによる新機能の創出

研究課題名(英文)Development of novel materials by design of artificial proteins

研究代表者

J・R・H Tame (Tame, Jeremy)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00336588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：いくつかの新規タンパク質が作製され、そしてそれらが別々のサブユニットから自己集合する能力について試験された。様々なポリオキソメタレート(POM)クラスターおよび対称性が一致する対称人工タンパク質を組み合わせて、我々が以前に設計および記載したピザと呼ばれるタンパク質との大規模ハイブリッドアセンブリを構築した。様々な生物物理学的技法を使用してPOM-ピザ相互作用を測定し、複合体の結晶構造を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いくつかの癌細胞類は細胞外面にasialo-GM1という糖脂質を提示している。イガイの一種からみつかった新規レクチン(SEVIL)がasialo-GM1の糖鎖部分に結合することがわかった。すでにSEVILの結晶構造解明に成功しており、このタンパク質から有用な癌検出ツールを開発するためのさらなる研究を進めている。SEVILの糖鎖に対する親和性は、比較的弱いため、SEVILが大きな多量体を形成するようなタンパク質の設計を試みている。これにより、非常に敏感な糖鎖検出ツールを創出できる。

研究成果の概要(英文)：Several novel proteins have been created, and tested for their ability to self-assemble from separate subunits. Various polyoxometalate (POM) clusters and symmetrical artificial proteins of matching symmetry have been combined to build large-scale hybrid assemblies with a protein called Pizza, that we designed and described previously. The POM-Pizza interaction was measured using various biophysical techniques, and crystal structures of the complexes were solved. In a separate project, a novel lectin from a species of mussel was found to bind to the glycan of asialo-GM1. The crystal structure of this protein has been solved, and further work to develop a useful biomedical tool from this protein, by building larger networks with it, is underway.

研究分野：生化学

キーワード：人工たんぱく質 構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報である DNA から転写・翻訳されて作り出されたタンパク質分子は、アミノ酸配列に従って特定の立体構造に折りたたむことで機能を発現し、様々な生命現象を生み出す。望みの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、様々な生命現象の制御および設計、さらには医療等において貢献することが可能になる。本研究は、自然界に存在しないタンパク質分子の計算機を用いて合理的にデザインすることにより、タンパク質分子の安定性の解明と、新たな機能解明の創出を目指す。近年、タンパク質設計は数年にわたって急速に発展し、新たな創出されている。しかし、理論的な計算により、三次的な立体構造を構築する事が難問で、計算集約的なタンパク質設計成功するグループはなく、世界中の研究者の挑戦的な課題になっている。

2. 研究の目的

タンパク質分子の三次元立体構造は、規則的な水素結合パターンにより生じる α -helix や β -sheet の二次構造がループでつながったものが三次元的に配置したものとして通常理解されている。本研究者は対称性が高いタンパク質の構造を用いて、理論的な計算により、三次的な立体構造を新たな創出により、安定な対称性を持つ新規タンパク質の設計を挑み、異なる基本構造と高い対称性を持つタンパク質設計を行った。

3. 研究の方法

方法は、対称性、配列アラインメントおよびソフトウェアパッケージ Rosetta の組み合わせを使用した。所望の形状を有する天然タンパク質を鋳型として選択し、そしてその進化経路を計算して、従来の祖先のアミノ酸配列を誘導する。次に実験的検証の前に、これらの配列を構造的安定性についてコンピュータで計算を行い、その確認を新たに設計されてタンパク質の発現、精製、構造解明を行った。

4. 研究成果

(1) Mitsuba

タンパク質の構造は 20 種類のアミノ酸が一次的につながった鎖状高分子であり、そのアミノ酸配列に従って固有の三次元立体構造へと折りたたみ機能を果たす、基本的な概念から、近年 10 年間、急速に進歩して来たが、応用研究までつながる成果はほとんど、報告されていない。本研究者は、バーキッドリンパ腫細胞を認識する新しい人工 β トレフォイルレクチンの分子設計し、新規の癌治療や診断法の基礎を見出すことを目指す。「ミツバ」と呼ばれる新しいタンパク質は、天然の貝類レクチン MytiLec-1 の構造に基づいて設計された分子である。これは、ユニークな配列モチーフを使って α -D-ガラクトースに結合する小さなレクチンファミリーとして分類され、MytiLec-1 の 3 つのサブドメインはそれぞれ 1 つのガラクトース結合部位を持ち、149 残基のタンパク質で、溶液中でタイトなダイマー構造を形成している。ミツバ分子は、MytiLec-1 サブユニットの構造を対称的に拘束することによって形成されており、3 回繰り返す構造をしており、150 残基のアミノ酸からなる。この Mitsuba-1 分子の大腸菌を用いて、タンパク質を発現、精製、結晶化に成功し、構造解明に成功した。解明された Mitsuba-1 分子は分子計算による予測モデルと一致することを確認できた。新規分子の Mitsuba-1 は、表面に糖鎖グロボトリオース(Gal α (1,4)Gal β (1,4)Glc)結合による癌細胞を認識する機構の解明することができた。

(2) Tako と Ika

プロペラタンパク質は、ブレードと呼ばれるサブドメインで構成された擬対称的な折り畳み構造をもっており、タンパク質構造の最大のファミリーの 1 つを形成している。それらは豊富であるだけでなく、しばしばタンパク質複合体の集合のためのプラットフォームとして作用することによって、多種多様な細胞プロセスにも関与している。WD40 タンパク質は、固有の酵素活性を有さないプロペラタンパク質のサブファミリーであるが、それらの安定したモジュラー構造および多用途表面により、それらを多くの重要な役割に適応させるための進化が可能になった。WD40 タンパク質の進化の歴史における重複、融合および多様化の事象をコンピュータでリバースエンジニアリングすることによって、Tako8 と呼ばれる完全に対称的なホモログが作られた。Tako8 の 2 つまたは 4 つのブレードが単一のポリペプチドとして発現される場合、それらは 8 ブレード構造を完成させるために自己集合しない。これは、環の内側の狭い間隔の負電荷が原因である可能性がある。Tako8 を再設計して、隣接するブレードが補償電荷を持つ 4 回対称タンパク質である Ika8 を作成するために、異なる計算手法が採用されました。それぞれサブユニット当たり 2 つまたは 4 つのブレードを有する Ika2 および Ika4 は、溶液中で完全に 8 枚のブレードを有するリングに自発的に集合することが見出された。これらの人工 8 ブレードリングは、バイオナノテクノロジーにおいて、そして WD40 タンパク質の折り畳みおよび進化を研究するためのモデルとしての用途を見出すことができる。

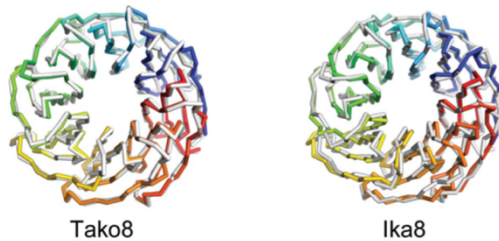


図1。Tako8 と Ika8 の構造を示す。

(3) Pizza の誘導体

Pizza6 は、バイオナノテクノロジーの有用な構造で、 β プロペラタンパク質の折り畳みや進化を調べるためのツールであり、新規タンパク質の創生が期待されている分子である。Pizza6 繰り返す構造の折り畳みの研究は、モニターフルオロフォアとして作用するための高い安定性を要求される。また、埋め込まれた Trp 残基の欠如により困難な分子設計である。本研究者はいくつかの Trp 含有 Pizza 6 誘導体を設計し試み、全部で4つのタンパク質が設計され、そのうち3つは精製され、構造解明に成功した。結晶構造は、これらの変異型タンパク質が予想される構造を維持することを確認し、そして変性時に Trp 蛍光発光の明らかな赤方偏移が観察された。派生タンパク質の中でも、Pizza6-AYW は天然のプロペラタンパク質と同等の安定性を持つため、将来の折りたたみ/展開の速度論研究に最も適したモデルタンパク質の構造を提示した。

(4) POMs

長年の間、化学者は、貯蔵および送達から触媒作用までの範囲の用途のために、多孔性の生体適合性材料の分子設計を試みた。タンパク質はそのようなナノ材料を作製するための魅力的な基盤であるが、タンパク質の自己組織化特性と、ポリオキシメタレート (POM) などの無機中心の触媒力とを組み合わせるフレームワークの作製においては成功の例はない。POM

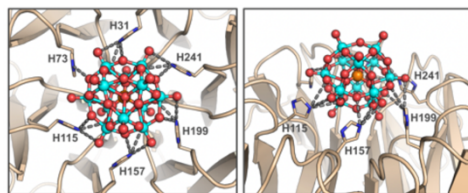


図2。Pizza たんぱく質の POM 複合体を示す。

は、多種多様な反応を触媒する対称的なクラスターの大きなファミリーである。本研究者は人工の対称タンパク質を新規の高度に多孔質の格子構造に組み立てる異なる POM の能力を調べ、いくつかのタンパク質-POM 複合体結晶構造解明し、それらは新しい触媒材料または貯蔵材料の開発につながる可能性が開いた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Noguchi H, Addy C, Simoncini D, Wouters S, Mylemans B, Van Meervelt L, Schiex T, Zhang KYJ, Tame JRH, Voet ARD. Computational design of symmetrical eight-bladed β -propeller proteins. *IUCrJ*. (2019) 6, 46-55.

doi: 10.1107/S205225251801480X

② Natarajan C, Jendroszek A, Kumar A, Weber RE, Tame JRH, Fago A, Storz JF. Molecular basis of hemoglobin adaptation in the high-flying bar-headed goose. *PLoS Genet*. (2018) 14(4):e1007331.

doi: 10.1371/journal.pgen.1007331.

③ Noguchi H, Mylemans B, De Zitter E, Van Meervelt L, Tame JRH, Voet A.

Design of tryptophan-containing mutants of the symmetrical Pizza protein for biophysical studies. *Biochem Biophys Res Commun*. (2018) 497(4):1038-1042.

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.168.

④ Ohki M, Sato-Tomita A, Matsunaga S, Iseki M, Tame JRH, Shibayama N, Park SY.

Molecular mechanism of photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase.

Proc Natl Acad Sci U S A. (2017) 114(32):8562-8567.

doi: 10.1073/pnas.1704391114.

⑤ Voet ARD, Tame JRH.

Protein-templated synthesis of metal-based nanomaterials.

Curr Opin Biotechnol. (2017) 46:14-19.

doi: 10.1016/j.copbio.2016.10.015.

〔学会発表〕（計 5 件）

①Jeremy Tame Protein design for new frameworks and networks
The Second International workshop by the 174th committee JSPS on Symbiosis of Biology
and Nanodevices Kyoto Japan 29th January 2019 (招待講演) 国際学会

②Jeremy Tame A Vision of the future BIO NANO 2018 Krakow Poland
17th-18th September 2018 (招待講演) 国際学会

③Jeremy Tame Photoactivation of a light-regulated adenylate cyclase
The Astbury Conversation UK
16th -17th April 2018 (招待講演) 国際学会

④Jeremy Tame Aspects of Protein Design Symposium
KU Leuven University Belgium 7th -9th October 2017 (招待講演) 国際学会

⑤Jeremy Tame Seeing the light with BLUF proteins JCUP VIII
大手町サンスカイルーム、Tokyo Japan 25th -26th May 2017 (招待講演) 国際学会

〔図書〕（計 1 件）

Approaches to Entropy (Springer-Nature)

ISBN 978-981-13-2315-7

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：池上 貴久

ローマ字氏名： Ikegami Takahisa

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：生命医科学研究科

職名：教授

研究者番号 (8桁)：20283939

※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、研究者個人に帰属されます。