

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2010

課題番号：18310149

研究課題名 (和文) デノボ設計による蛋白質構造機能相関の解明

研究課題名 (英文) Studies on protein structure-function relationship by de novo design

研究代表者

磯貝 泰弘 (ISOGAI YASUHIRO)

富山県立大学・工学部生物工学科・准教授

研究者番号：00201921

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：蛋白質、分子設計、立体構造、フォールディング、生理活性

### 1. 研究計画の概要

天然蛋白質が示す立体構造や機能に関する特性は、ポリペプチドとしての高分子の性質と、進化の過程で選択された特定のアミノ酸配列が指定する生物学的性質の両者が複合したものである。したがって、天然蛋白質に関する研究だけでは、この両者を区別して議論することは困難である。そこで、我々が蛋白質について持っている知識を総動員して、“はじめから”蛋白質のアミノ酸配列をデザインし、合成・解析を行う研究、すなわち、「デノボ蛋白質設計」の手法が有効となる。本研究課題では、申請者がこれまで行ってきた蛋白質設計の研究成果を基盤にして、蛋白質の構造物性（とくに構造揺らぎ）と蛋白質機能の関係を解明することを目的として、複数の人工蛋白質の設計と合成、構造と機能の解析を行う。

### 2. 研究の進捗状況

(1) NMR 構造が解かれているデノボ Cro 蛋白質のフォールディング変異体を多数作成し、構造物性について解析した。その結果、天然蛋白質の変性過程では、異なる二次構造 ( $\alpha$ ヘリックスと  $\beta$ シート) が協同的かつ同時に壊れるのに対して、デノボ蛋白質では、 $\beta$ シートだけが協同的に早く壊れ、 $\alpha$ ヘリックスは非協同的にゆっくり壊れた。また、フォールディング中間体が安定で非協同的な折りたたみ過程を示す変異体は、凝集体やアミロイドの形成能も高い、という傾向が示された。これらの結果、天然蛋白質のアミノ酸配列が分子進化の過程で、協同的なフォールディング反応を示すように選択されてきた理由について重要な示唆が得られた。

(2) 藍藻や紅藻の光合成に関与する非ヘム色素蛋白質であるフィコシアニンの主鎖骨格を利用して、新規の人工ヘム蛋白質の設計を行った。

まず、フィコシアニンとミオグロビンの立体構造をアラインメントして重ね合わせ、ミオグロビンのヘム結合部位に対応するフィコシアニンのアミノ酸残基をミオグロビンの残基に置換した。さらに、フィコシアニンのコアを形成するアミノ酸残基のうち、数残基をより小さな残基に置換して蛋白質内部のスペースを広げ、ヘム結合部位を設計した。このような 130 アミノ酸残基からなるフィコシアニン変異体 (HPY) を合成して、生化学実験を行った。その結果、HPY は、設計通り、1 分子のヘムを特異的に結合し、野生型と同様な全体構造と協同的なフォールディング特性を保持していることが分かった。さらに、ヘムを結合した HPY は、他の人工ヘム蛋白質が示す一般的な酸化還元電位よりも 50mV 程度高いポテンシャルを示したが、ミオグロビンが持つような分子状酸素との可逆的な結合能は示さなかった。この結果は、ミオグロビンの生理機能が、ヘムの結合とグロビン様の全体構造、天然様のフォールディング特性だけでは実現されないことを示す。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

これまでに得られている結果は、天然蛋白質が示す協同的なフォールディング特性は、その生理機能よりもむしろ、濃厚な細胞質溶液の中で、凝集体やアミロイドの形成を阻害するために獲得されたものである、という結論を導く。この結論は、当初の予想とは異なるが、蛋白質の分子進化における選択圧の要因を考える上で重要である。新規のヘム蛋白質を設計し合成することにも成功した。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後は得られた結果を学会や学術論文の形で発表するとともに、得られた成果の産業への応用を視野に入れて、以下の研究を行う予定である。

- (1) 天然には存在しない、新規の立体構造をもつ人工蛋白質の設計と合成を行う。
- (2) アミロイド形成のメカニズムを解明し、材料として利用可能な蛋白質ナノファイバーを創製するために、これまでに設計した人工蛋白質や天然蛋白質の変異体を基盤として、新しい機能をもつ蛋白質複合体の設計と合成を行う。
- (3) 蛋白質の凝集やアミロイド形成の傾向性を考慮することにより、実用的な「安定性」指標を再定義する。実際にいくつかの代表的な球状蛋白質やその変異体について、新しく定義した安定性の値を実験的に決定する。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 磯貝泰弘、太田元規、 $\lambda$ Cro フォールドのデノボデザイン、生物物理、第 47 巻、第 3 号、185-189、2007、査読有り
- ② T. Takekiyo, N. Takeda, Y. Isogai, M. Kato, Y. Taniguchi, Pressure stability of the alpha-helix structure in a de novo designed protein ( $\alpha$ -F $\alpha$ )<sub>2</sub> studied by FTIR spectroscopy, *Biopolymers* **12**, 185-188, 2007、**査読有り**
- ③ Y. Isogai, Native protein sequences are designed to destabilize folding intermediates, *Biochemistry* **45**, 2488-2492, 2006、査読有り
- ④ Kashiwagi, K., Isogai, Y., Nishiguchi, K., Shiba, K., Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution. *Protein Engineering Design & Selection* **19**, 135-140, 2006、査読有り

[学会発表] (計 14 件)

- ① H. Imamura, Differences in structural cooperativity between natural and de novo Cro proteins revealed by temperature and pressure-variable FT-IR spectroscopy、新学術領域研究「揺らぎと生体機能」/特定領域研究「水と生体分子」合同シンポジウム、2009年3月16日、岡崎
- ② 磯貝泰弘、非ヘムグロビンフォールドを利用した新規ヘム蛋白質のデザイン、計算タンパク質科学研究会、2008年9月5日、富山
- ③ 磯貝泰弘、タンパク質のデノボ設計と新規物質生産、石川・富山県立大学合同シンポジウム、2008年11月28日、富山
- ④ 磯貝泰弘、人工タンパク質の完全設計と構造決

定、理研シンポジウム、2007年3月9日、埼玉  
⑤ Y. Isogai、Structure-based design of folding cooperativity of a de novo Cro protein、生物物理学会年会、2006年11月12日、沖縄

[その他]

- ① NHK 教育テレビ「サイエンスゼロ」(生命の営みをになうタンパク質-夢の人工タンパク質に挑む-)、2006年10月7日 19:00-19:44、2006年10月10日 00:50-01:34 (再放送)、2006年10月10日 14:00-14:44 (NHK デジタルハイビジョン)