

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

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

研究成果の概要 (和文)：

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 (α ヘリックスと β 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、 β シートだけが協同的に早く壊れ、 α ヘリックスはゆっくり非協同的に壊れた。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。これらの結果から、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獲得した理由は、それが直接蛋白質機能に結び付く、というよりも、細胞毒性の高いアミロイドや凝集体の形成を回避するためである、と結論した。

研究成果の概要 (英文)：

The *de novo* designed Cro protein (Isogai et al., *J. Mol. Biol.* 354, 801-814, 2005) and its core variants were synthesized to investigate the sequence dependence of the protein folding. The designed Cro proteins unfold in a non-cooperative, anomalous manner with temperature increased, whereas the native lambda phage Cro protein exhibits cooperative unfolding, in which the secondary structures collapse in the identical time courses. In the designed proteins, α helices gradually disrupted slower than β sheets. The degree of the folding non-cooperativity, or stability of folding intermediate, correlates with the tendency to form insoluble protein aggregate or amyloid fibrils. The present results indicate that amino acid sequences exhibiting cooperative folding can be further selected from the sequences that fold into a well-defined structure, and that the native-like folding properties represent one of the driving forces in naturally occurring sequence selection. Native proteins may have acquired their folding cooperativity under selective pressure to avoid formation of the toxic aggregate or amyloid fibrils in the molecular evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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. 研究開始当初の背景

酵素や転写因子が示す高度で複雑な機能は、天然蛋白質特有の構造特性に依存している。とくに、多数の疎水基を含むにもかかわらず、水溶液に対して高い溶解度を保持し、巨大な分子量を持つにもかかわらず、単一な立体構造に折り畳まれることは、天然の球状タンパク質がもつ優れた分子物性の核心である（これらの性質により、私たちはNMRやX線結晶構造解析を使って蛋白質の詳細な立体構造決定を行うことが可能となる）。さらに、球状蛋白質の折れたたみ過程や酵素のアロステリック効果に見られるような、蛋白質分子内および分子間の相互作用は協同的であり、これらのことが天然蛋白質が示す“蛋白質らしい”構造物性の源となっている。これまでに、多くの蛋白質のアミノ酸配列と立体構造が解明されてきたにもかかわらず、天然の蛋白質にとらわれない物理化学的な観点から、どのようなアミノ酸配列が上記の天然様の構造物性を実現し、それがどの様に蛋白質機能に結びついているのかについて明らかになっていることは少ない。この問題を解決することは、現在の分子生物学上の主要な研究課題の一つであり、また応用面では、将来、人間が思い通りの構造と機能をもった人工蛋白質をデザインするために必須の課題でもある。

2. 研究の目的

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的性質と、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、我々がこれまで行ってきた蛋白質設計の研究結果を基盤にして、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。

3. 研究の方法

人工蛋白質のアミノ酸配列は、計算機を

用いた自動的な方法や手動によるモデル構築によって作成した。具体的には、作りたい立体構造の各アミノ酸部位の表面/内部トポロジー（埋もれ度）や二次構造、アミノ酸残基間の親和性など蛋白質の分子内環境を考慮し、それに適合したアミノ酸を選んで並べた。タンパク質の合成は、設計したアミノ酸配列をコードする人工遺伝子と大腸菌を用いて行った。タンパク質の精製は、逆相、イオン交換、ゲル濾過クロマトグラフィーを組み合わせるにより行った。電気泳動とHPLC、質量分析により合成されたポリペプチドの同定を行った。CD、NMR、蛍光・紫外可視光吸収分光法を組み合わることにより、合成した蛋白質の構造と物性の解析を行った。アミロイド繊維の形成は、溶液試料に添加したチオフラビンTの蛍光測定により確認した。

4. 研究成果

(1) デノボCro蛋白質のNMR構造に基づいて、蛋白質コア内の複数の部位に残基置換を導入し、複数のフォールディング変異体を作成した。これらの変異体について、CDやNMR、赤外分光学等を用い構造物性の解析を行った。その結果、天然蛋白質の変性過程では、異なる二次構造（ α ヘリックスと β シート）が協同的かつ同時的に壊れるのに対して、デノボ蛋白質では、 β シートだけが協同的に早く壊れ、 α ヘリックスはゆっくり非協同的に壊れることが判明した。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ものほど、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。これらの結果は、協同性の高いフォールディング特性を示すアミノ酸配列は、単一の立体構造に折り畳まれる多数のアミノ酸配列からさらに厳選されており、天然様のフォールディング特性の獲得が、アミノ酸配列の自然選択において重要な選択圧になったことを示している。

天然蛋白質のアミノ酸配列が、分子進化の過程でフォールディング反応が協同的になるように選択されてきた理由は、それが直接蛋白質機能と結びついているというよりも、細胞毒性の高いアミロイドや凝集体の形成を回避して、正しく折り畳まれた状態で生体内に存在するためである、と結論した。

(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 (図1)。

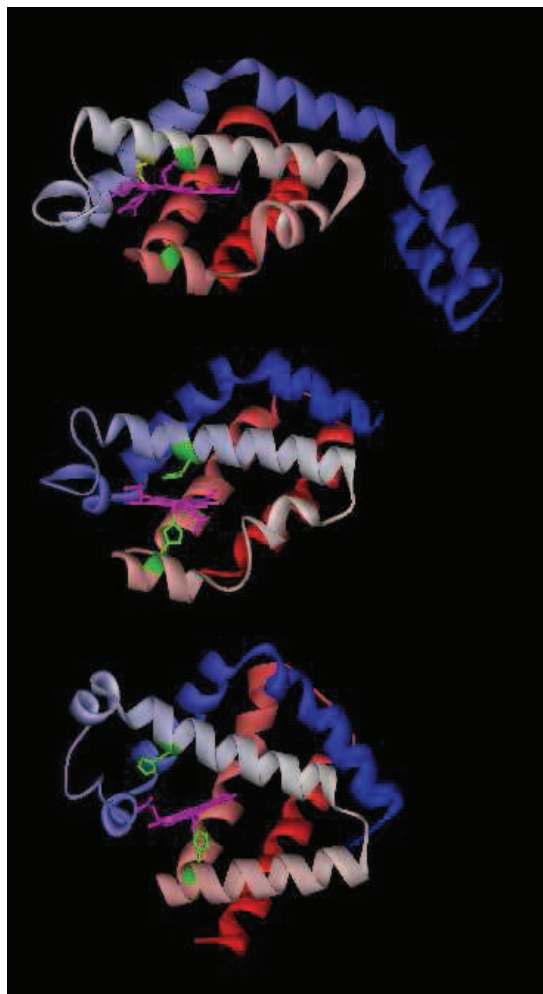


図1. 上から、藍藻のフィコシアニンのX線結晶構造 (pdbコード1b33L)、ヘム結合フィコシアニン変異体のモデル構造、アメフラシミオグロビンのX線構造 (1dm1A)。

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、6残基をより小さな残基に置換してコア内の空隙を広げ、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 (図2)。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た。しかし、ヘムを結合したHPYは、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反応は示さなかった。これらの結果、天然ミオグロビンの機能を実

現するためには、ヘムの結合とグロビンの全体構造、天然様のフォールディング特性だけでは充分でないことが分かった。

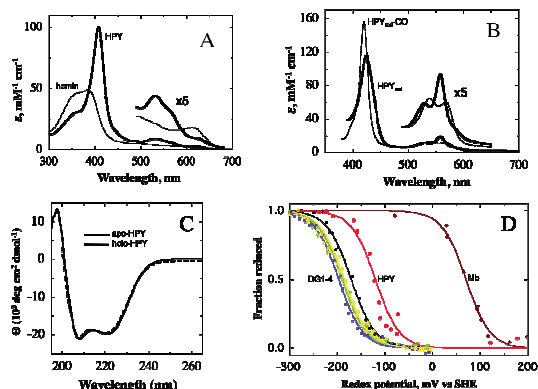


図2. AとB、酸化型および還元型ヘム結合フィコシアニン変異体 (HPY) の可視光吸収スペクトル。C、ホロおよびアポHPYのCDスペクトル。D、HPYの酸化還元滴定、天然および人工グロビンとの比較。

(3) 天然には存在しない新規フォールドをもつ人工蛋白質の設計と合成を試みた。新規フォールドは、 λ ファージ由来Cro蛋白質 (λ Cro) のモノマー変異体の溶液構造を基にして、そのN末からC末への主鎖トレースを、新規構造ではC末からN末への主鎖トレースとなるように書き換えて作成した (図3)。

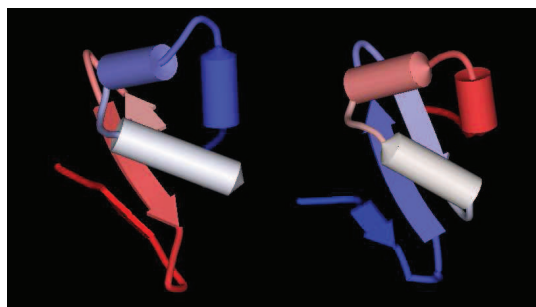


図3. 左、天然 λ Croモノマー変異体の立体構造 (3ORC)。右、今回設計のターゲットとして作成したリバースCroのモデル構造。青がN末、赤がC末を示す。

このようにして得られた新規構造をターゲットとして、経験的ポテンシャル関数を用いた自動計算により、新規のアミノ酸配列の設計を行った。まず、計算に組成等の制限を入れずに、目的の立体構造とポテンシャル関数のみを使って得られた配列をコードする人工遺伝子を合成し、大腸菌に導入して発現させた。得られた人工蛋白質の構造をCDやNMRを使って解析した結果、二次構造含量について、目的とした立体構造に対して期待される値より小さく、構造決定に必要な単一な立体

構造を形成していないことが判明した。そこで、アミノ酸組成について拘束条件を設定し、アミノ酸配列の最適化計算を行った。良好な立体構造モデルが得られた複数の設計配列とその変異体を合成し、CD と NMR により、構造物性の測定を行った。その結果、塩基性の等電点と天然蛋白質程度の大き過ぎない平均残基分子量の組成制限が、リバーズ Cro の立体構造形成に有効であることが判明した。

(4) アミロイド形成能の高いポリペプチド（ウシ由来ホスファチジルイノシトール-3'-キナーゼの SH3 ドメイン）を、リンカー配列を介して、ヘムを結合する人工 4 本ヘリックスバンドルタンパク質（bHH）に結合することにより、電気伝導性をもつナノファイバーの設計と合成を行った（図 4）。

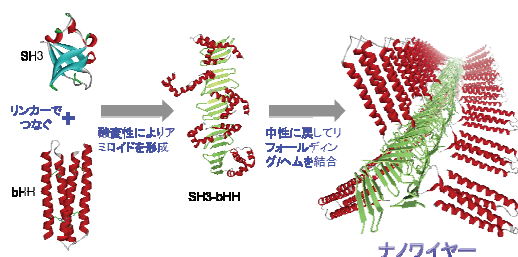


図 4. 人工蛋白質を利用したナノワイヤーの設計。

合成したポリペプチドを中性 pH のバッファーに溶かして、CD の測定とゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、SH3 無しの bHH と同様に 4 本ヘリックスバンドルを形成し、ヘムも結合した。この試料を酸性条件下におくと、ヘリックス構造が壊れる一方、数時間のオーダーでアミロイド繊維を形成することが判明した。形成したアミロイドを、pH ジャンプにより中性条件下に戻したところ、ヘリックス構造が再形成され、繊維は残存した。この試料にヘムを添加し、可視光吸収スペクトルを測定したところ、設計通りヘムが結合することが確認出来た。

5. 主な発表論文等

(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 8 件)

- ① H. Imamura, Y. Isogai, T. Takekiyo, M. Kato, Effect of pressure on the secondary structure of coiled coil peptide GCN4-p1. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 193-198, 2010、査読有
- ② Y. Isogai, M. Ishida, Design of a novel heme protein with a non-heme globin

scaffold. *Biochemistry* 48, 8136-8142, 2009、査読有

人工タンパク質設計の創薬への展開。

③ 磯貝泰弘, 太田元規
遺伝子医学 14、次世代創薬テクノロジー、実践：インシリコ創薬の最前線（メディカルドゥ）、66-70, 2009、査読無

④ 磯貝泰弘, 太田元規, λ 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

⑤ T. Takekiyo, N. Takeda, Y. Isogai, M. Kato, Y. Taniguchi, Pressure stability of the alpha-helix structure in a de novo designed protein (α -T α)₂ studied by FTIR spectroscopy, *Biopolymers* 12, 185-188, 2007、査読有

⑥ Y. Isogai, Native protein sequences are designed to destabilize folding intermediates, *Biochemistry* 45, 2488-2492, 2006、査読有

⑦ 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

⑧ 磯貝泰弘, 望みの立体構造をもった人工タンパク質をデザインする。バイオニクス 3, 66-67, 2006、査読無

[学会発表] (計 10 件)

① Y. Isogai, M. Ishida, Design of a novel heme protein with a non-heme globin scaffold, 第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 20-22 日、熊本

② 加藤稔、今村比呂志、竹清貴浩、磯貝泰弘、タンパク質の α -ヘリックス構造は圧力に対して安定か?: モデルペプチドから得られた知見、第 32 回溶液化学シンポジウム、2009 年 11 月 18-20 日、新潟

③ H. Imamura, E. Chatani, Y. Isogai, M. Kato, 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

④ 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、第 4 回タンパク質ゲノム構造研究会、2008 年 9 月 5 日、富山

⑤ 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

⑥ 石田学、山崎伊織、村上裕太、太田元規、磯貝泰弘、今井清博、組換え祖先型ミオグロビン：酸素結合特性に対する pH 及び温度の

効果、日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21-23 日、横浜

⑦ 石田学、村上裕太、安田温、山崎伊織、太田元規、磯貝泰弘、今井清博、祖先型と最近接種ミオグロビンの自動酸化反応の温度依存性、日本生物物理学会第 45 回年会、2007 年 12 月 21-23 日、横浜

⑧ 磯貝泰弘、立体構造と機能のデザイン、第 3 回タンパク質・ゲノム構造研究会、2007 年 8 月 2 日、箱根

⑨ 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

⑩ 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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

①ホームページ

<http://www.pu-toyama.ac.jp/BR/hashimot/>

② 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)

6. 研究組織

(1) 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：00201920

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

太田元規 (OTA MOTONORI)

名古屋大学・情報文化学部・自然情報学科・
複雑システム系・教授

研究者番号：40290895