

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14668

研究課題名（和文）計算機デザイン手法による酵素タンパク質のオリゴマー化と熱安定性の解析

研究課題名（英文）Computational design and thermal stability analysis of oligomeric proteins

研究代表者

小林 直也（Kobayashi, Naoya）

 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・特任研究員

研究者番号：60781945

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）：本研究の目的はオリゴマー形成が構造の安定化にどう寄与するのかを構成的アプローチにより解明するための基盤技術を開発することである。この目的のために本研究では、計算機デザイン手法による熱安定化変異体の予測手法の開発及び合理的な変異タンパク質の熱安定性解析、モノマー構造からオリゴマーを計算機デザイン手法により創出する技術の開発を試みた。

本研究で開発した熱安定化変異体予測手法、多種多様なシメトリーオリゴマー構造生成プログラム、ペプチドバーコードを用いた物性スクリーニング系は、タンパク質の高次構造形成と構造安定性をハイスループット解析する基盤技術を与える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質の熱安定性や会合状態を合理的に改変するための計算機技術や改変したタンパク質の物性をハイスループット解析する技術を開発した。これらの技術を組合せ、応用することにより、創ることを通してタンパク質の高次構造形成への理解を深めることができるようになる。また、これまで天然になかった立体構造とアミノ酸配列からなるタンパク質を創り出せることにより、新たなタンパク質機能の発現が期待できる。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study is to develop a fundamental technique to clarify how oligomer formation contributes to structural stabilization using a synthetic biological approach. For this purpose, we attempted to develop a method for predicting thermally stabilized mutants by computer design, to analyze the thermal stability of rationally designed proteins, and to develop a technique for creating oligomers from monomeric structures by computer design.

The methods developed in this work, such as thermal stabilization mutant prediction methods, diverse symmetry oligomer structure generation programs, and physicochemical property screening systems using peptide barcodes, provide fundamental technologies for high-throughput analysis of higher-order structure formation and structural stability of proteins.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質デザイン オリゴマー構造 改変酵素 熱安定性解析 物性スクリーニング ペプチドバーコーディング 超並列デザイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然のタンパク質立体構造に関するデータベース解析から、タンパク質の約半数はオリゴマーとして存在していることが分かっている。なぜ自然界のタンパク質はモノマーに折りたたむだけでなくオリゴマーを形成するのだろうか。オリゴマー形成は機能発現に重要であると考えられるが、タンパク質がオリゴマーを形成するもう一つ別の理由として、タンパク質の安定性の向上が考えられる。なぜなら、タンパク質は複合体を形成することで、オリゴマー界面での相互作用によるエネルギー利得を獲得できると考えられるからである。オリゴマー形成がタンパク質の安定性に与える効果は、天然のオリゴマー形成タンパク質を改変することで検証されており、確かにオリゴマー形成が構造全体の安定化に寄与していることが示されている。しかし、オリゴマー形成の構造安定化に対する寄与を解明するためには、モノマー構造からオリゴマー構造を実際に創り出すことで、そのオリゴマーの安定性を検証する必要がある。これまでには、オリゴマーを人工デザインすることは難しかったが、最近の計算機を用いたタンパク質合理デザイン技術の進歩(Huang, PS. et al. *Nature* 537, 320-27 (2016); Koga, N. et al. *Nature* 491, 222-7 (2012); Lin, YR. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E5478-85 (2015))により、オリゴマーのデザインに成功した研究報告例が増えてきている。そこで本研究では、オリゴマー形成が構造の安定化にどう寄与するのかを構成的アプローチにより明らかにする基盤技術を開発するために、計算機デザイン手法による熱安定化変異体の予測手法の開発及び合理的改変タンパク質の熱安定性解析とモノマー構造からオリゴマーを計算機デザイン手法により創り出す技術の開発を目指した。

計算機デザイン手法による合理的改変のターゲットタンパク質として、本研究では、中温菌由来のモノマー型 β -グルコシダーゼを選んだ。本研究でターゲットとする β -グルコシダーゼは、セロビオースを加水分解し、グルコースを生成する酵素であり、セルロース系バイオマスの酵素糖化工程への応用が期待されているタンパク質である。 β -グルコシダーゼの熱安定性を向上させることができれば、高温でセロビオースの糖化反応を行うことができるようになり、基質の溶解度の向上や分解反応時間の短縮、さらには反応中の雑菌の繁殖を抑えることができる。この酵素を計算機デザイン手法によって熱安定化に試みた先行研究としては、モノマー構造の活性部位付近に着目したデザインがある(Carlin, DA. et al. *PLoS One*. 11, e0147596 (2016); Carlin, DA. et al. *PLoS One*. 12, e0176255 (2017))。しかし、これらの研究で作製された129種類の変異体のうち、 2°C 以上熱安定性が向上したものは3種類しかなく、それらの変異体はいずれも酵素活性を失っており、熱安定化に成功しているとは言い難かった。そこで本研究は、酵素活性を保ちつつ熱安定性が向上する変異体予測手法の開発と予測した変異の安定化効果を生化学実験により検証することにした。

天然由来のモノマータンパク質の多くは不安定であり、生合成した際の収量が少ないため、天然のタンパク質を用いてはオリゴマー化変異の効果を実験的に検証しづらいと考えられた。そこで本研究では、モノマー構造からオリゴマーを計算機デザインするターゲットとして、安定性が高く、生合成による発現量の多いモノマー構造の人工タンパク質を選んだ。人工タンパク質を用いたオリゴマー化デザイン研究には α ヘリックスのバンドル構造及びリピート構造のモノマータンパク質を用いた研究報告があるが、本研究では先行研究で用いられた人工タンパク質よりも表面形状が複雑なグロビン様構造の人工タンパク質を用いてオリゴマー化デザインを行うことで、天然のオリゴマータンパク質に観られるような相互作用面がよく噛み合ったオリゴマーの創出を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、オリゴマー形成が構造の安定化にどう寄与するのかを構成的アプローチにより解明するための基盤技術を開発することである。この目的のために本研究では、計算機デザイン手法による熱安定化変異体の予測法の開発及び合理的改変タンパク質の熱安定性解析とモノマー構造からオリゴマーを計算機デザイン手法により創り出す技術の開発に試みた。

3. 研究の方法

本研究では、以下の3つを実施した。

(1) ターゲットとする酵素タンパク質の熱安定化変異体の作成及び熱安定性解析

本研究では、ターゲット酵素タンパク質としてセルロース含有バイオマスの分解に関わる β -グルコシダーゼに着目した。この β -グルコシダーゼの変異導入に対する安定性の変化を調べるために、計算機タンパク質デザイン手法を応用して熱安定化するアミノ酸変異の予測を行った。 β -グルコシダーゼを耐熱化するアミノ酸変異を予測するために、タンパク質データベースに登録されているターゲットとする β -グルコシダーゼの結晶構造に対して、そのタンパク質構造の主鎖二面角パターンと主鎖の埋もれ環境に基づいたデータベース解析を行い、アミノ酸配列の各部位に好まれるアミノ酸組成を示す配列プロファイルを作成した。次に、作成した配列プロファイルに基づき、タンパク質構造デザインソフトウェア Rosetta 及び Foldit standalone を用いた変異体構造モデリングを行い、変異導入前のモデル構造と変異導入後のモデル構造で立体構造上の衝突や大きなエネルギースコアの損失が生じていないかを確認し、熱安定化が期待されるアミノ酸変異を予測した。

変異体の熱安定性を測定するため、部位特異的変異導入手法により予測したアミノ酸へと置換

した β -グルコシダーゼ単一変異体遺伝子を作製した。作製した β -グルコシダーゼ変異体遺伝子は、大腸菌によるタンパク質発現実験、円偏光二色性分光測定による熱安定性解析、酵素活性測定を行うことで、熱安定化への変異の効果を検証した。熱安定性を向上させた変異については、それらの変異を組合せた多重変異体遺伝子を作製し、単一変異体と同様、大腸菌によるタンパク質発現実験、円偏光二色性分光測定による熱安定性解析、酵素活性測定を行うことで、予測された熱安定化変異の累積的な効果を検証した。

(2) 計算機を用いた巡回対象オリゴマータンパク質構造デザイン

分子サイズが小さく、シンプルな立体構造を持つモノマー人工タンパク質をターゲットとして、2回回転対称から7回回転対称までのオリゴマータンパク質構造の計算機デザインを行った。計算機デザイン手法としては、タンパク質構造デザインソフトウェア Rosetta のプログラムを用いて、目的とするシメトリーにモノマー構造を置き、タンパク質分子をランダムに並進と回転させながら形状相補性が高く、かつ、モノマーあたりの相互作用面の面積が大きくなる配置を探索した。デザインしたタンパク質は、そのアミノ酸配列をコードした合成 DNA を購入し、大腸菌タンパク質発現系を用いて購入した合成 DNA からデザインタンパク質を発現させ、可溶性分画をポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析することで、デザインタンパク質の折りたたみ能力を調べた。可溶性分画に発現したタンパク質は、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、ゲルろ過クロマトグラフィー-多角度光散乱(SEC-MALS)実験による分子量・会合数の解析を行うことで、オリゴマー形成能力を評価した。

(3) 複数タンパク質の混ざり物溶液に対する物性スクリーニング系の開発

(2)では計算機を用いてオリゴマー構造をデザインする手法を開発した。しかしながら、研究成果で後述する通り、この手法を用いてデザインしたタンパク質を大腸菌で発現させ、会合状態を解析した結果、目的の会合数のオリゴマー構造を得ることはできなかった。本研究で開発した計算機オリゴマーデザイン手法により、オリゴマー構造自体は多数生成することができた。しかし、研究開始当初の実験系では、実際に実験的に検証できたデザインは、生成したデザインオリゴマー構造のうちのごく一部であり、デザインしたすべての配列についてオリゴマー形成能力を検証できる新しい実験系が必要となっていた。そこで、この課題を根本から解決するために、研究開始当初には予定していなかったことだが、デザインした膨大な数のオリゴマー構造すべてを混ざったまま状態で、会合状態や熱安定性など、デザインタンパク質の物性を反映した指標によって一度にスクリーニングする実験系の開発に試みた。

ターゲットとするタンパク質に対してオリゴマー化デザインを施した場合に生成されるタンパク質のアミノ酸配列はどれも互いに非常に似ており、それらが多数混ざった状態である場合、目的の物性を示したタンパク質を同定することは困難であると考えられた。そこで、個々のタンパク質に異なる配列のペプチドバーコードを付けることにより、互いに似たアミノ酸配列を持つタンパク質を物性で選抜し、同定する方法の開発を行った。目的タンパク質にペプチドバーコードを付けるために、pET ベクターをベースとした新しいプラスミドの構築を行った。ペプチドバーコードは、トリマーオリゴを用いたランダムオリゴヌクレオチドライブラリー合成 DNA を購入し、PCR により増幅した後、構築したプラスミドにクローニングすることで作成した。会合状態の異なる人工タンパク質が混ざった状態の溶液から会合状態の違いに基づいてタンパク質を同定するテストのために、同じ残基数で同じ折りたたみ構造を持つ会合数の異なる3種類の人工タンパク質にペプチドバーコードを付加して、スクリーニングを行った。3種類の人工タンパク質にはそれぞれ異なるペプチドバーコードを付け、別々のタンパク質を発現する大腸菌を混ぜた状態で培養した後、バーコード付き人工タンパク質を精製し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより会合状態の違いでふるい分けて分取した分画からペプチドバーコードを回収した。回収したペプチドバーコードを質量分析することにより、どの会合状態に3種類のうちのどの人工タンパク質が含まれていたのかを同定した。

4. 研究成果

(1) ターゲットとする酵素タンパク質の熱安定化変異体の作成及び熱安定性解析の成果

予測した変異体の遺伝子を作製し、大腸菌によるタンパク質発現実験、円偏光二色性分光測定による熱安定性解析、酵素活性測定を行うことで、耐熱性への変異の効果を検証した。その結果、予測した変異のうち14か所の単一変異体は、 β グルコシダーゼの熱安定性を平均約 1°C ずつ向上させた。この14か所の変異を組合せた多重変異体では累積的な熱安定性の向上が観察された。最終的に14か所すべての変異を導入した14重変異体は、野生型に比べて熱安定性が 10°C 向上し、大腸菌発現系を用いた際の発現量も改善したことで酵素タンパク質の収量が2倍以上多く得られるようになった。さらに、この14重変異体について、 50°C で長時間加熱後の残存酵素活性を測定したところ、野生型は24時間で完全に酵素活性が失活するのに対し、14重変異体では96時間以上加熱を続けても全く酵素活性を失わなかった。この研究により得られた耐熱化 β グルコシダーゼは産業用バイオマス資化酵素に有望であるとして特許出願を行った。本研究の計算機デザイン手法を応用した熱安定化変異予測法は、ターゲットとするタンパク質の立体構造が既知であれば利用することができ、また酵素活性を失わせないため、広く酵素タンパク質の安定化への応用が期待される。

(2) 計算機を用いた巡回対称オリゴマータンパク質構造デザインの成果

多様な対称構造を設計するために、凹凸の多いグロビン様フォールドのモノマー人工タンパク質と凹凸の少ないロスマンフォールドやフェレドキシン様フォールドのモノマー人工タンパク質を基に、Rosetta のプログラムを用いたシメトリードッキングシミュレーションにより、2 回回転対称から 7 回回転対称までのオリゴマー構造を生成し、自然界に存在するオリゴマータンパク質と同程度の相互作用表面積と形状相補性を持つオリゴマー構造を探索した。凹凸の多いグロビン様フォールドを基にしたドッキングでは、凹凸の少ないロスマンフォールドやフェレドキシン様フォールドを基にした場合よりも多く、望ましい相互作用表面積と形状相補性を持つオリゴマー構造が得られた。特に、会合数の多い 4 回回転対称以上のシメトリーデザインにおいてこの傾向がみられた。生成されたオリゴマー構造をクラスタリングし、各クラスターの代表構造を決め、それらのオリゴマー構造のサブユニット間の疎水性相互作用を強める側鎖構造を設計した。5 回回転対称構造で 6 種類のアミノ酸配列、6 回回転対称構造で 5 種類のアミノ酸配列、7 回回転対称構造で 1 種類のアミノ酸配列について、生化学的および物理化学的実験を行い、その物性を評価した。野生型に比べて変異数の多いものでは 15 ケ所の分子表面の親水性残基が疎水性残基に置換されているにもかかわらず、いずれのデザインタンパク質も可溶性分画に発現した。精製したこれらのデザインタンパク質について SEC-MALS 実験による分子量・会合数の解析を行った結果、目的の会合状態を持つオリゴマー構造の形成は確認できなかった。

本研究を通して、多種多様な巡回対称オリゴマータンパク質モデル構造を計算機により生成するプログラムを作成することができた。今後、相互作用面の側鎖構造をデザインするプログラムの改善と目的の物性を示すデザインタンパク質のハイスループットスクリーニング系を構築することができれば、本研究で開発した巡回対称オリゴマー構造生成プログラムと組み合わせることで、様々な形状と会合数を持つオリゴマータンパク質が創出できるようになると考えられる。

(3) 複数タンパク質の混ざり物溶液に対する物性スクリーニング系の開発の成果

目的タンパク質にペプチドバーコードを付加するために 3 種類の新しいプラスミドを作成した。作成したプラスミドのうちの 1 種類のプラスミドにおいて、ペプチドバーコードに基づいたタンパク質同定システムが狙い通りに機能することを確認することができた。このプラスミドを用いて、会合状態が異なる人工タンパク質の混ざり物溶液から会合状態の違いに基づいてタンパク質を同定する実験を行った。その結果、ゲルろ過クロマトグラフィーの分画情報と最終的に検出されたペプチドバーコードから、それぞれのタンパク質の会合状態を明らかにすることができた。本研究では 3 種類のタンパク質とペプチドバーコードを用いたが、本研究で作成したペプチドバーコードライブラリを使うことで数千種類以上の配列相同性の高いタンパク質を混合状態から同定することが可能になると考えられる。このペプチドバーコードを用いた物性スクリーニング系は、会合状態の違いだけでなく、熱や pH 等に対する安定性や他分子への結合能力に基づくスクリーニングへの応用展開も考えられ、タンパク質の高次構造形成と構造安定性をハイスループットに解析する基盤技術を与える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Naoya, Inano Kouichi, Sasahara Kenji, Sato Takaaki, Miyazawa Keisuke, Fukuma Takeshi, Hecht Michael H, Song Chihong, Murata Kazuyoshi, Arai Ryoichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Self-Assembling Supramolecular Nanostructures Constructed from de Novo Extender Protein Nanobuilding Blocks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1381-1394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.8b00007	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 KOBAYASHI Naoya, ARAI Ryoichi	4. 巻 58
2. 論文標題 Self-assembling Supramolecular Complex Nanostructures Constructed from de Novo Protein Nanobuilding Blocks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 313-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.58.313	査読の有無 無
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 小林 直也、川上 了史、新井 亮一	4. 巻 91
2. 論文標題 人工タンパク質ナノブロック複合体の設計開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 255-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910255	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林直也, 古賀信康
2. 発表標題 多様なタンパク質複合体構造の合理デザインに向けて
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会(新潟)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, N., Minami, S., Uchiyama, T., Sunagawa, N., Igarashi, K., and Koga, N.
2. 発表標題 Toward design of thermostable beta-glucosidase with structure-based sequence profile
3. 学会等名 International Symposium on "Artificial Cell Reactor Science and Technology" (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, N.
2. 発表標題 Cumulative thermostabilization of beta-glucosidase with structure-based sequence profile information
3. 学会等名 分子研研究会「New Frontier in Protein Design & Engineering」(愛知)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, N., Minami, S., Uchiyama, T., Sunagawa, N., Igarashi, K., Noji, H., and Koga, N.
2. 発表標題 Toward design of thermostable beta-glucosidase with structure-based sequence profile
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会 (岡山)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林直也, 南慎太郎, 小杉貴洋, 内山拓, 砂川直輝, 五十嵐圭日子, 野地博行, 古賀信康
2. 発表標題 立体構造に基づく配列プロファイルを利用した β -グルコシダーゼの熱安定化
3. 学会等名 最終成果報告会 人工細胞リアクタが拓くイノベーション (東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoya Kobayashi, Nobuyasu Koga
2. 発表標題 Toward creation of artificial proteins self-assembling into diverse symmetric structures: computational design and experimental screening
3. 学会等名 The 1st International Symposium on Molecular Engine (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 耐熱性 グルコシダーゼ	発明者 古賀信康, 小林直也, 南慎太郎	権利者 自然科学研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-172810号	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----