

4C09

## 機能を持った理想的な蛋白質の理論設計

(ワシントン大学・生化) ○小杉 貴洋, 古賀 信康, 古賀 (巽) 理恵,  
Baker David

## Theoretical Design of Ideal Proteins with a Function

(University of Washington, Department of Biochemistry)

○ Takahiro Kosugi, Nobuyasu Koga, Rie Tatsumi-Koga  
and David Baker

【序】 機能を持つ蛋白質を新たに創り出すことは、産業的に有用であるだけでなく、設計原理を探求する過程や設計された蛋白質を評価する過程において、蛋白質の機能をより深く理解することを可能にする。そのため、これまでに数々の蛋白質が設計され、それらの蛋白質が実際に機能を持つ事が実験的に確認されてきた。しかしながら、これまでのデザインは全て天然の蛋白質を基に設計されているため、基にした構造とほぼ同じ主鎖構造を持っており、適用出来る対象や活性の向上に限界があることも報告されている。そのため、任意の対象に高活性な蛋白質を創り出すためには、主鎖構造も一から創る必要があると考えられる。

近年、David Baker らは生体高分子デザインプログラム Rosetta<sup>1</sup> を用いる事で、Kemp eliminase や Retro-aldase といった酵素、ステロイドのような低分子や Influenza Hemagglutinin などの蛋白質に結合する蛋白質、そして自己会合する蛋白質など様々な蛋白質のデザインに成功してきた。これらのデザインでは、望んだ機能を実現出来る可能性が高い主鎖構造を自然界に存在する蛋白質の中から選び出し、そのアミノ酸配列を部分的に変える事により、望みの機能を持たせており、これにより蛋白質のデザインの幅が大きく広がることになった。しかしながら、これらのデザインにおいてさえ、主鎖構造は自然界に存在する構造に限られるため、適用範囲や機能の最適化には限界がある。そこで、主鎖構造を最適化するために、まず自然界には存在しない主鎖構造を自由に創り出す方法が必要となる。近年、理想的な蛋白質の主鎖構造を創り出すための規則が発見され、その規則を用いる事により折りたたみに最適化された様々な理想的な蛋白質構造を一から作り出す事が可能になった<sup>2</sup>。ここでデザインされた蛋白質は理想的な構造を持っている非常に安定な蛋白質であるが、機能は持っていない。そこで、この方法を発展することにより、主鎖構造を一から創りつつ、機能を備えた蛋白質を作り出すことを試みた。

【方法】 まず、デザインしたい蛋白質の二次構造の配置とそれらのつながり（トポロジー）を決め、そのトポロジーに折りたたみやすいように理想構造を作る規則に従ってその二次構造の長さを決める。ここでは、Phosphate を結合する非常に安定な蛋白質を作るために、Phosphate Binding Loop (P-loop) モチーフが組み込まれたトポロジーを持つ $\alpha/\beta$ 蛋白質をデザインすることにした。この P-loop モチーフは Kinase などに含まれ GXXXXGK(T/S) という配列をもつ Loop 構造で ATP や ADP などの Phosphate を

結合することが知られている。まず望みのトポロジーをもつ主鎖構造を作り出すために、二次構造フラグメントライブラリからフラグメントを取り出し、それらをつなげていった。そして、このフラグメントを何度も繰り返し置き換えることにより、Rosettaのスコアが低く望みのトポロジーを持つ蛋白質の主鎖構造を作り出した。その後、この主鎖構造に対して、これらを安定にする様に側鎖を発生させた。さらに、その側鎖の二面角をモンテカルロ法により最適化し、全体の原子座標も構造最適化した。こうして候補となる構造を多数作り出し、それらの構造の中から Rosetta スコアの低い構造を選び、P-loop モチーフの近くに Ligand を置いた。そして、P-loop モチーフと Ligand の間に拘束をかけて、側鎖のデザイン、二面角の最適化、構造最適化を再び行った。最後に、デザインされた構造の中から Rosetta スコアの低いものを選び、拘束を外して構造最適化を行った。こうして出来上がったデザイン配列を用いて、何度も構造予測を行い、そこから得られた構造のアンサンブルがデザイン構造の近くまでたどり着く事やファネル状になっていることを確認した。これらを満たしたデザインに対して、実際に実験を行ってそのデザインの正しさを示した。

【結果】 計算機により設計したデザイン配列が、どのように振る舞うのかを実験により確認するために、大腸菌を用いてこの蛋白質を発現し、Ni カラムを用いて精製した。目的の蛋白質が発現されていることは、Mass スペクトルと SDS-PAGE により確認した。次に、円偏光二色性(CD)スペクトルを測定することにより、この蛋白質がデザインした通りの  $\alpha/\beta$  蛋白質であることが示された。さらに、様々な温度で CD スペクトルを測定した結果、このスペクトルは高温になっても変化することがなく、かなり安定な蛋白質であることを確認した。また、SEC-MALS により、この蛋白質が溶液中でモノマーであることも示された。以上により、デザインされた蛋白質が、適当な構造を保っていることを確認した。次に、表面プラズモン共鳴(SPR)分析法と Fluorescence Polarization 法を用いることにより、Ligand と結合していることを確認した。また、P-loop モチーフに保存されている Lys を変異することにより、Ligand が P-loop モチーフに結合している事も確認した。

【結論】 今回の研究において、デザインするトポロジーに P-loop モチーフという Phosphate を認識する配列を P-loop モチーフが安定になるようにそして結合サイトが十分に確保されるように適切に導入することにより、非常に安定な Phosphate 結合蛋白質を作り出す事に成功した。このようにして結合能力を持つ蛋白質が作られたので、今後このデザインをもとにして、人工進化によりアミノ酸配列を最適化する事や Phosphate 以外の部分も認識出来る主鎖構造や配列を用いる事で、活性を上げていく事が可能である。さらに、今回の研究と同様の手続きは Ligand を結合することが知られている様々なモチーフに対して行うことが可能であり、様々な Ligand を結合する蛋白質をデザインすることが出来る。また、Ligand の結合だけでなく、酵素の活性部位を適切に配置することにより、酵素活性を持つ蛋白質を作る事も可能である。当日時間があればこれについても報告する。

#### 【参考文献】

- [1] Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. & Baker, D. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods Enzymol.* **383**, 66-93 (2004).
- [2] Koga, N. *et al.* Principles for designing ideal protein structures. *Nature* **491**, 222-227 (2012).