

2005年10月21日

独立行政法人 理化学研究所
国立大学法人 東京工業大学

人工タンパク質の完全設計と構造決定に成功

- 自然界にはない新しい機能をもった人工タンパク質の設計も可能に -

◇本研究成果のポイント◇

- ・ 特定の立体構造に折りたたまれるアミノ酸配列の設計法を確立。
- ・ 全配列設計・全合成した人工タンパク質の溶液構造を決定。
- ・ 複雑な折りたたみ構造の設計に日本で初めて成功。

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）播磨研究所放射光科学総合研究センター城生体金属科学研究室の磯貝泰弘先任研究員と国立大学法人東京工業大学（相澤益男学長）学術国際情報センターの太田元規助教授の研究グループは、特定の立体構造をもつ人工タンパク質の完全設計に成功しました。近年、理研をはじめとする国内外の研究機関によって、多数の天然タンパク質の立体構造が次々に解明されていますが、これらのデータの蓄積を最大限活用した研究成果です。研究グループは、天然タンパク質の立体構造データベースから作成した経験的なポテンシャル関数を使って、目的とする立体構造上での各アミノ酸部位の埋もれ度や二次構造、アミノ酸残基間の相互作用など、タンパク質の分子内環境に適合したアミノ酸を選んで並べていくことによって、全長のアミノ酸配列を設計する新しい手法の開発を行いました。従来手法で設計された人工タンパク質の多くは、実際に合成してみると、安定な主鎖の折りたたみ構造をもっている場合でも、天然タンパク質に較べて、タンパク質を構成するアミノ酸側鎖の構造揺らぎが大きいため、核磁気共鳴（NMR）分光法やX線結晶構造解析によって詳細な立体構造決定が困難でした。研究グループは、理論計算と合成・解析を繰り返すことによって設計法の改良を行い、今回、65個のアミノ酸からなるλフェージ*1由来DNA結合タンパク質の立体構造に折りたたまれるようなアミノ酸配列の設計を行いました。このアミノ酸配列をもつ人工タンパク質を遺伝子工学的な手法を用いて全合成し、NMR分光法による構造解析を行ったところ、ほぼ設計通りの立体構造を形成していることが明らかになりました。従来のタンパク質工学では、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部を改変する研究が主流でしたが、本研究は、特定の立体構造に折りたたまれるタンパク質のアミノ酸配列全体を、人間が「はじめから」設計出来ることを示しました。今回のような複雑な折りたたみ構造をもつ人工タンパク質を設計・合成し、構造決定に至ったのは日本初で世界でも稀な成果です。本研究によって、将来、環境ホルモンを効率良く分解する人工酵素など、天然には存在しない新規の構造と機能をもつ人工タンパク質を設計できるようになる可能性が広がりました。

本研究成果は、英国の科学雑誌『*JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*』オンライン版（10月24日の週）に掲載予定です。

1. 背景

酵素や転写因子などの天然タンパク質が示す洗練された機能は、それらの分子に特有な立体構造特性に依存しています。とくに、分子量が大きく、多数の疎水性残基を含んでいるにもかかわらず、水溶液の中で高い溶解度を示し、単一の立体構造を形成することは、天然の球状タンパク質がもつ優れた分子物性の核心です。天然タンパク質のこれらの性質のおかげで、NMR や X 線結晶構造解析を使って、その立体構造を知ることが可能となります。タンパク質分子が、これらの特性を実現するためのアミノ酸配列を決定することが、研究グループのデノボタンパク質設計 (de novo protein design) の目標です。

球状タンパク質は一般的に、複雑な折りたたみ構造をもっているために、これをデザインするためには、計算機の利用が欠かせません。これまで、このような手法で設計された人工タンパク質の多くは、実際に合成してみると、安定な主鎖の折りたたみ構造をもっている場合でも、天然タンパク質に較べて側鎖の構造揺らぎが大きく、水に対する溶解度は低いものでした。このために、せっかく合成しても、NMR や X 線結晶構造解析によって詳細な立体構造決定が出来ませんでした^{*2}。それゆえ、立体構造情報に基づいて、構造特性を再設計することも、機能化の再設計を行うことも出来ませんでした。研究グループは、こうした問題を解決するために、理論計算と合成、解析を繰り返すことによって設計法の改良を行い、NMR を用いて溶液構造が決定できるような単一の立体構造に折りたたまれる人工タンパク質の設計を目指しました。

2. 研究手法と成果

具体的には、図 1 に示すような計算科学的手法を用いて、任意の立体構造に折りたたまれるアミノ酸配列を設計する方法を考案しました。この方法は、作りたい立体構造の中にある各アミノ酸部位の埋もれ度や二次構造、アミノ酸残基間の親和性など、タンパク質の分子内環境に適合したアミノ酸を選んで並べていくことによって、人工的なアミノ酸配列を設計するものです。設計した人工タンパク質の合成と構造物性の解析を行い、結果を設計法にフィードバックします。これを繰り返すことによって、設計法の改良を行い、分子内環境と各アミノ酸の適合性を見積もりを正しく出来る様になりました。

タンパク質の全合成は、化学合成 DNA から人工遺伝子を作成し、ベクターを使って大腸菌に導入・発現することによって行いました。上記の改良した設計法を用いて、 λ フェージの DNA 結合タンパク質 (λ Cro) の立体構造を最適化するアミノ酸配列の設計を行いました。 λ Cro は、二次構造として α ヘリックスと β シートをもつ古典的な転写因子です。 λ Cro の複雑な折りたたみ構造は、DNA の 2 重らせん構造の

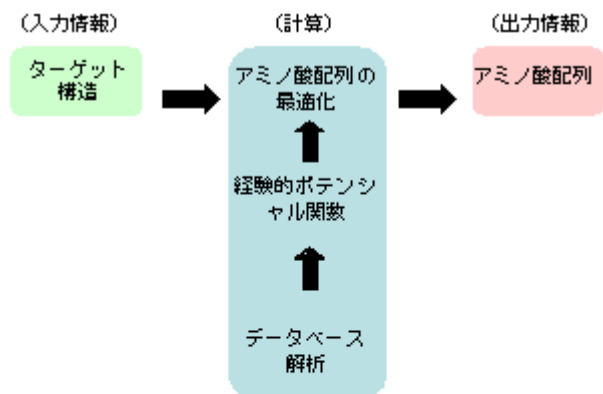


図 1. デノボタンパク質設計。
天然タンパク質の立体構造データベースの統計的解析から各アミノ酸とタンパク質分子内環境との適合性を見積もる経験的ポテンシャル関数を作成しておく。この関数と適当な最適化法を使って、作りたいタンパク質の立体構造 (入力情報) に対して最小のエネルギーを与えるアミノ酸配列 (出力情報) を計算する。

中の大きな溝にフィットするよう精妙にデザインされており、その生理活性を直接反映している点に注目して、設計のターゲットとして選びました。合成された人工タンパク質は、これまでの人工タンパク質に特有の問題点である過度の構造揺らぎが解消されており、良好な構造物性を示す単一の立体構造を形成しました。そこで、NMR 分光法を使って、その溶液構造を決定しました (図 2 左)。得られた立体構造は、設計のターゲットとした天然 λ Cro モノマー変異体の X 線構造と比較して、良い精度で一致していました (図 2 右)。

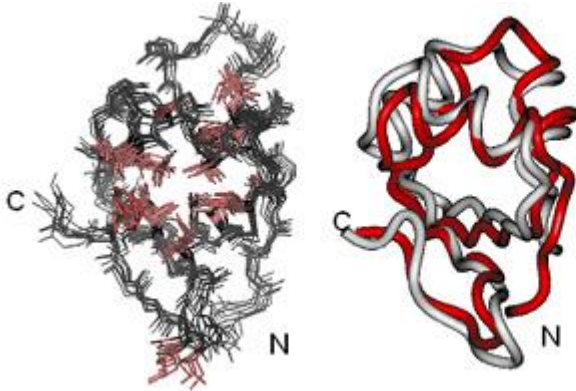


図2. (左) 人工 Cro タンパク質の NMR 解析から得られた 10 個の最低エネルギー構造。ポリペプチド主鎖を黒の実線、疎水性残基の側鎖をピンクの棒モデルで示した。(右) 天然および人工 Cro タンパク質の立体構造の比較。赤が人工タンパク質の平均溶液構造、白が天然 λ Cro モノマー変異体の X 線結晶構造を示す。両者のアミノ酸配列は 75%異なっているものの、立体構造はよく似ていた。

3. 今後の期待

従来のタンパク質工学では、自然選択の結果生成した天然タンパク質のアミノ酸配列を部分的に改変する研究が主流でしたが、本研究では、特定の立体構造に折たまれるタンパク質のアミノ酸配列全体を、人間が「はじめから」設計出来ることを示しました。国家プロジェクトである「タンパク 3000 プロジェクト」をはじめとして、昨今のタンパク質構造に関するデータが蓄積されてきたことによる、タンパク質研究の大きな進展であると言えます。本研究で得られた成果を発展させることで、将来、環境ホルモンを効率良く分解する酵素や病原遺伝子の発現を特異的に阻害する薬物タンパク質など、天然には存在しない新しい機能をもつ人工タンパク質を設計できるようになることが期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 播磨研究所

放射光科学総合研究センター 城生体金属科学研究室

前任研究員 磯貝 泰弘

Tel : 048-467-4583 / Fax : 048-467-9649

研究推進部

猿木 重文

Tel : 0791-58-0900 / Fax : 0791-58-0800

国立大学法人東京工業大学 学術国際情報センター

助教授 太田 元規

03-5734-3679 / Fax : 03-5734-3678

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

国立大学法人東京工業大学 総務部評価・広報課

Tel : 03-5734-2975 / Fax : 03-5734-3661

<補足説明>

- ※1 大腸菌を宿主とする代表的な細菌ウイルス。このファージに関する遺伝生化学的研究により、生物学上の重要な法則と知見が得られている。 λ Cro タンパク質は、Jacob と Monod によるオペロン説（タンパク質の発現調節機構に関する学説）の中で重要な役割を果たす。

- ※2 これまでに NMR や X 線結晶構造解析によって詳細な立体構造が決定された人工蛋白質は数例あるが、本研究で設計された立体構造はこれまでで最も非対称で複雑な折りたたみ構造をもつ（図 2）。