

配列パターンデザインによる新規人工設計タンパク質の半合理的創製と構造解析および ナノ構造構築への応用

信州大学繊維学部応用生物科学系 新井 亮一

1. はじめに

新規人工設計タンパク質（デノボタンパク質、*de novo protein*）とは、天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにせず、新規にアミノ酸配列を設計した人工タンパク質である。タンパク質を自由自在にデザインし、望みの構造や機能を創り出すことができるようになれば、新規酵素や医薬品の開発、さらにはナノバイオテクノロジーの発展等にも大きく貢献できると考えられ、タンパク質工学研究の究極的目標である。しかしながら、20種類のアミノ酸をランダムに100残基つなげる場合、 20^{100} = 約 1.3×10^{130} 通りもの莫大な配列組み合わせがあり、その中から安定な構造や優れた機能を持つタンパク質の配列を探索することは極めて困難である。新規人工設計タンパク質の創製において、安定な構造や優れた機能を持つタンパク質の配列をいかにしてデザインし、選択するかは非常に本質的で重要な課題であるが、現在でも大変困難な問題である。

これまでに、新規人工設計タンパク質の創製は、主に三種類の方法で行われてきた。立体化学的および物理化学的なアプローチにより合理的に設計する方法、ランダムな組合せのアミノ酸配列ライブラリーから選択する方法、そして、これらの合理的な方法とランダムな組合せの方法の両方の要素を取り入れた配列パターンデザインによる半合理的方法である。

本研究では、この半合理的方法であるバイナリーパターン法を用いて創製した新規人工設計タンパク質 WA20 について、X線結晶構造解析法を用いて、ユニークなドメインスワップ二量体構造を解明した。さらに、最近では、この特徴的な構造を活かした“タンパク質ナノブロック”を開発し、ナノ構造複合体構築への応用を目指した研究を展開しているので、併せて紹介する。

2. 配列パターンデザインによる新規人工設計タンパク質の半合理的創製

著者が2006～2007年に研究留学したプリンストン大学の Michael H. Hecht 教授の研究室では、その半合理的方法であるバイナリーパターン法により配列パターンをデザインしたアミノ酸配列ライブラリーを用いて、新規人工設計タンパク質を創製する研究が早くから盛んに行われてきた(1,2)。バイナリーパターン法とは、水溶性球状タンパク質の表面には親水性アミノ酸が多く配置され、内部には疎水性アミノ酸が多く配置される性質に着目して、目的タンパク質の二次構造及び三次構造に応じて、親水性アミノ酸(Asn、Asp、Gln、Glu、His、Lys のいずれか)と疎水性アミノ酸(Ile、Leu、Met、Phe、Val のいずれか)の2種類の繰り返し配列パターンを半合理的にデザインする方法である。これまでに、バイナリーパターン法を用いて α ヘリックスの周期に従って1～3残基毎に親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸のパターンをデザインした両親媒性 α ヘリックス構造や、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸のパターンを1残基毎に交互にデザインした β ストランド構造を持つ新規人工設計タンパク質等が創製されてきた(2)。

Hecht 研究室では、このバイナリーパターン法を用いて、特に、4本の両親媒性 α ヘリックスを順にループでつないで束とした4本ヘリックスバンドル構造の新規人工設計タンパク質について、これまでに重点的に研究してきた。特に、機能を持つ人工設計タンパク質の創製を目指して、バイナリーパターンを保持し、 α ヘリックスの両端以外の部分とループ部分のアミノ酸残基をライブラリー化した第3世代の4本ヘリックスバンドル新規人工設計タンパク質ライブラリーが作製された(図1)(3)。この人工タンパク質ライブラリーから獲得した高発現タンパク質クローンの中より、構造が特に安定であり、変性剤によって二状態転移を示し、弱い酵素活性も有する新規人工設計タンパク質 WA20 が得られた(3)。そこで、この WA20 の構造的特徴を詳細に解明することを目的として、X線結晶構造解析による立体構造解析を試みた。

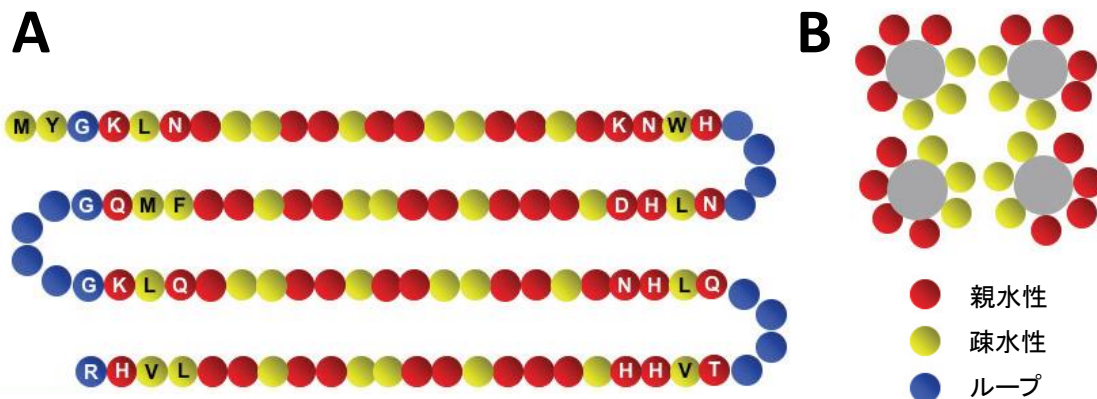


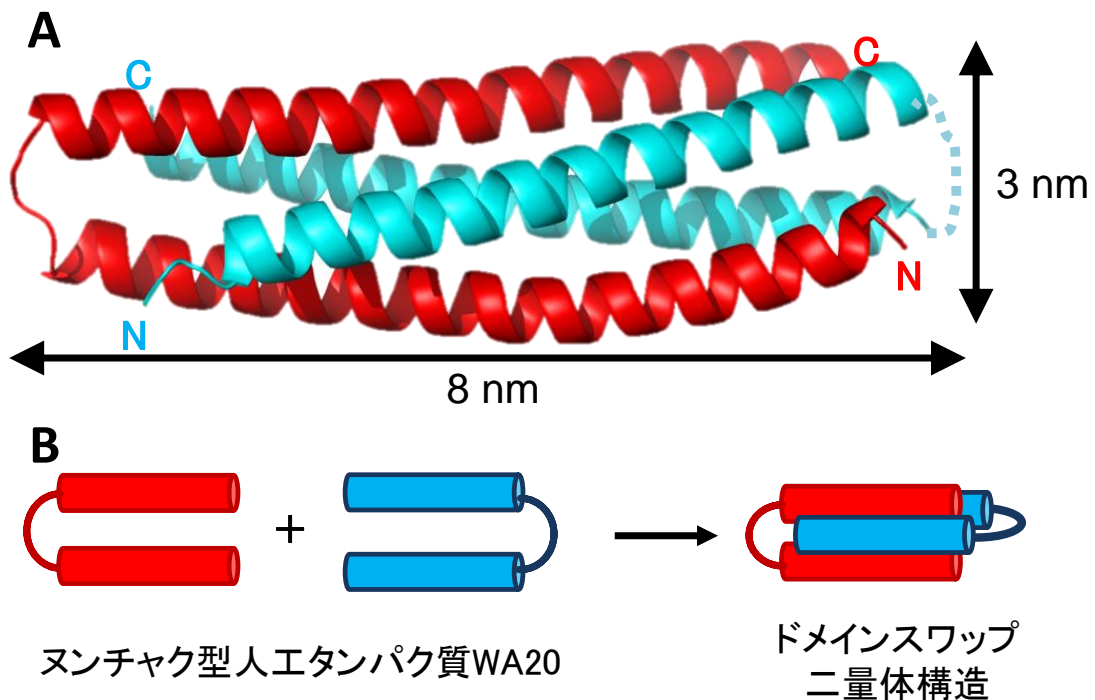
図1 バイナリーパターン法による4本ヘリックスバンドルデオボタンパク質ライブラリー (A) バイナリーパターン法によりデザインされた第3世代4本ヘリックスバンドル新規人工設計タンパク質ライブラリー模式図(3)。数珠状の球のひとつひとつはアミノ酸残基を表す。2~3残基毎に疎水性アミノ酸を配置し、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸のパターンをデザインした両親媒性 α ヘリックスが4本形成し、ループでつなぐように設計されている。(B) デザインした4本ヘリックスバンドル構造の断面模式図。4本の両親媒性 α ヘリックスからなる束の内側に疎水性アミノ酸残基が集中し、外側には親水性アミノ酸残基が配置するように設計されている。

3. 新規人工設計タンパク質WA20の立体構造解析

新規人工設計タンパク質WA20は、大腸菌を用いてSeMet置換体を発現し、各種クロマトグラフィーにより高純度に精製した。様々な結晶化条件を検討して得られた結晶についてKEK PF BL-5AにてX線回折データを収集し、多波長異常分散を用いて、X線結晶構造解析法により2.2 Å分解能で立体構造を決定した(PDB: 3VJF) (4)。非常に意外だったことに、WA20の結晶構造は、設計の際に想定していた単量体の4本ヘリックスバンドル構造ではなく、“二量体”の4本ヘリックスバンドル構造であった。それぞれのWA20単量体は、40~46残基の長い α ヘリックス2本からなる“ヌンチャク”のような構造を取り、その構造が、もう一方の単量体の構造とお互いに深く挟み込むように絡み合ったドメインスワップ二量体構造を形成していた(図2)。(ドメインスワップとは、複数の

タンパク質分子が、互いに部分的に絡み合うようにして、他の分子の構造の一部をあたかも自らの分子の構造の一部として取り込むように折り畳みながら、多量体形成することである。)

WA20の結晶構造では、バイナリーパターン法によりデザインした通りに、疎水性アミノ酸の側鎖は内側に向いており、親水性アミノ酸の側鎖は外側に向いていた。二量体形成の接触面は、疎水性クラスターのコアが形成されており、二量体接触面は塩橋や水素結合により、さらに安定化していた。WA20の熱安定性を測定したところ、変性温度 T_m は約70°Cと比較的高く、WA20の二量体構造では、単量体の4本ヘリックスバンドル構造の場合と比較して、疎水性コア部分が約2倍程度増加しており、高い安定性の要因となっていると考えられた。



WA20の二量体形成の鍵となるアミノ酸残基を推定するために、単量体4本ヘリックスバンドル新規人工設計タンパク質S-824の構造(PDB: 1P68)およびアミノ酸配列をWA20と比較すると、25-28番残基と77-80番残基の第1、第3ループ設計領域において顕著な違いが見られた。特に、立体構造上で、His26とGlu78の側鎖間で塩橋を形成し、この領域の構造を安定化していた。さらに、小角X線散乱法により、溶液中においても、WA20の全体的な大きさと概形は、長さ約8 nm、直径約3 nmの円筒状であり、二量体の4本ヘリックスバンドル構造を形成していることが示された。

また、WA20は、ヘムと結合して紫外可視吸収スペクトルでソーレー帯のピーク(約410 nm)を示し、弱いペルオキシダーゼ活性を持つことや、さらに、天然の酵素と比較すると非常に低い活性ではあるが、WA20は、弱いエステラーゼ活性やリパーゼ活性を持っている(3)。WA20のミカエリス・メンテン定数 K_m は、天然酵素の値と同程度であり、代謝回転数 k_{cat} は天然酵素に比べて約10000分

の1程度であった。そこで、エステラーゼ活性やリパーゼ活性の基質結合部位を推定するために、WA20結晶構造上のポケット部位を探索したところ、二つの比較的大きなポケット部位がA鎖とB鎖の間に見つかった。おそらく、WA20は基質結合部位を有するが、触媒残基は未だ適切に配置されていないことが推察される。今後、このようなポケット部位を持つWA20のドメインスワップ二量体構造をもとにして、分子進化工学的手法により触媒残基を最適化することにより、酵素工学分野への応用に向けて、新規人工設計酵素開発のためのシンプルでユニークな基本骨格構造として利用できる可能性も期待される。

4. 新規人工タンパク質WA20を利用したタンパク質ナノブロックの設計開発及びナノ構造構築への応用

上述のように、バイナリーパターン法によりデザインした新規人工タンパク質WA20は、ユニークな4本ヘリックスバンドルドメインスワップ二量体構造を形成することを明らかにした。さらに、最近では、このWA20の特徴的なドメインスワップ二量体構造を活かした“タンパク質ナノブロック(Protein Nano-building Block, PN-Block)”を設計開発し、新たに人工タンパク質のナノ構造複合体を創出することを目的とした研究を展開している。そこで、このWA20を利用したタンパク質ナノブロックの第1弾として、WA20とT4ファージfibrinの三量体形成foldonドメインとの融合タンパク質WA20-foldon人工融合タンパク質を設計開発した(図3)(5)。WA20-foldonを大腸菌で発現、精製し、Native-PAGEにより分析すると、数種類の複合体(多量体)構造を同時に形成した。これらを分離精製し、ゲルろ過クロマトグラフィーと小角X線散乱法により、主要な2種類の複合体small form (S-form)とmiddle form (M-form)の分子量を推定したところ、S-formは6量体、M-formは12量体を形成していることが示された。また、小角X線散乱法より得られた二体間距離分布関数 $p(r)$ 等からS-formとM-formのナノ構造複合体の概形は、それぞれ樽型構造と正四面体(テトラポッド)型構造であることが示唆された。

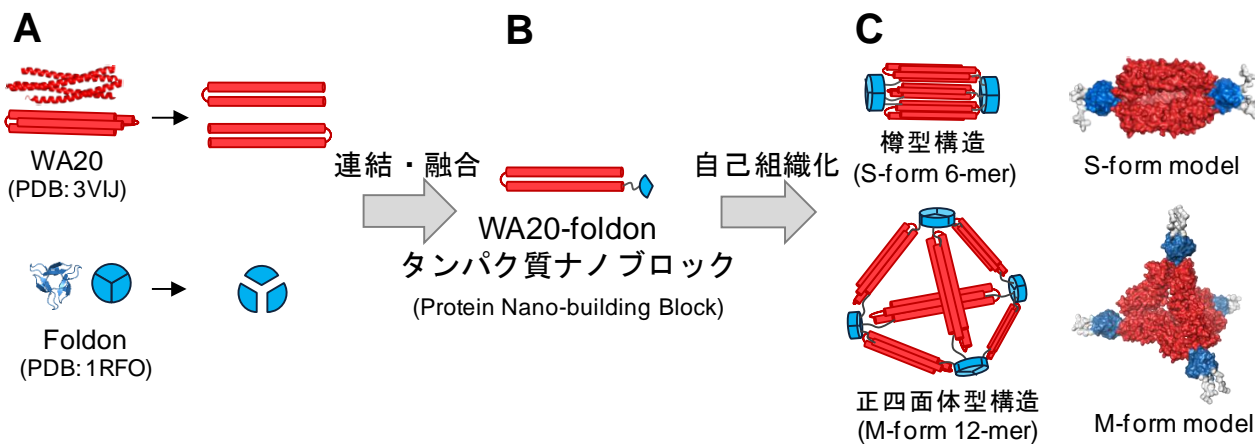


図3 タンパク質ナノブロックWA20-foldonの設計開発及びナノ構造複合体構築

(A) 新規人工タンパク質WA20とT4ファージfibrinの三量体形成foldonドメインのリボン図と模式図。(B) タンパク質ナノブロックWA20-foldon人工融合タンパク質の設計構築模式図。(C) WA20-foldonナノ構造複合体デザイン模式図と小角X線散乱より得られた構造モデル。

さらに、最近、リンカーを介してWA20タンパク質2個を直列につないだタンデムWA20のタンパク質ナノブロックを構築し、様々な人工タンパク質複合体を創出している。今後も、これらのユニークな構造や特性を活かして、さらなるタンパク質ナノブロックを開発し、組み合わせて自己組織化することにより、多様な人工タンパク質複合体の創出を目指していく。

5. おわりに

新規人工設計タンパク質を用いてタンパク質ナノブロックを設計開発し、ナノ構造複合体を創出する研究は、世界でも未だに報告例は少ない。今後、タンパク質が持つ特異的自己組織化能や高機能性を活かしたタンパク質ナノブロックの創出へ向けて、新規人工設計タンパク質を応用する研究をさらに進めていく。例えば、より安定性を向上させたナノブロックや、お互いが特異的に会合するナノブロック、金属等のリガンド依存的に自己組織化が誘導されるナノブロックなど、他にも様々な有用なタンパク質ナノブロックの設計開発を目指す。さらに、これらを自在に組み合わせていくことにより、天然タンパク質では実現できないような多様な構造や機能を持つ人工タンパク質ナノ構造複合体のデザインや創製につながると考えられ、タンパク質工学や酵素工学分野のみならず、合成生物学やナノバイオテクノロジー等の広範な研究分野に新たな可能性を拓いていくことが期待できる。

謝辞

本研究は、信州大学博士課程学生の小林直也氏を中心に、プリンストン大学のMichael H. Hecht教授や信州大学の佐藤高彰准教授らとの共同研究の成果であり、心より感謝致します。また、本研究は文部科学省テニュアトラック普及定着事業、科学研究費補助金、日本学術振興会の海外特別研究員、特別研究員制度等の多大な支援を受けて行われたもので、心より御礼申し上げます。最後になりましたが、学生時代から長年にわたり御指導頂き、このたびの酵素工学奨励賞に御推薦頂きました東京大学の長棟輝行教授をはじめ、酵素工学研究会の先生方及び関係者の皆様に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kamtekar, S., Schiffer, J. M., Xiong, H., Babik, J. M., and Hecht, M. H. (1993) Protein design by binary patterning of polar and nonpolar amino acids. *Science* **262**, 1680-1685
2. Hecht, M. H., Das, A., Go, A., Bradley, L. H., and Wei, Y. (2004) De novo proteins from designed combinatorial libraries. *Protein Sci.* **13**, 1711-1723
3. Patel, S. C., Bradley, L. H., Jinadasa, S. P., and Hecht, M. H. (2009) Cofactor binding and enzymatic activity in an unevolved superfamily of de novo designed 4-helix bundle proteins. *Protein Sci.* **18**, 1388-1400
4. Arai, R., Kobayashi, N., Kimura, A., Sato, T., Matsuo, K., Wang, A. F., Platt, J. M., Bradley, L. H., and Hecht, M. H. (2012) Domain-swapped dimeric structure of a stable and functional de novo four-helix bundle protein, WA20. *J. Phys. Chem. B* **116**, 6789-6797
5. Kobayashi, N., Yanase, K., Sato, T., Unzai, S., Hecht, M. H., and Arai, R. (2015) Self-assembling nano-architectures created from a protein nano-building block (PN-Block) using a intermolecularly folded dimeric *de novo* protein. *J. Am. Chem. Soc.*, [in press](#).