トピックス

λ Croフォールドのデノボデザイン

磯貝泰弘¹, 太田元規²¹理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター²東京工業大学学術国際情報センター

1. はじめに

Anfinsen らによるリボヌクレアーゼのフォールディング実験によると、その立体構造と機能はアミノ酸配列によって一意的に規定されている (Anfinsen の仮説)¹⁾。すなわち、天然の球状タンパク質に関しては、アミノ酸配列さえ指定すれば、適当な条件下、溶液中で化学平衡の法則にしたがい、自由エネルギー最小の単一な立体構造に折りたたまれる。この記述は現在、天然タンパク質の一般的な性質として認められているが、その内容は、ポリペプチド一般の化学的性質に起因するのではなく、進化の過程で選ばれてきたアミノ酸配列をもつ天然タンパク質にのみ適用できる生物学的な理由に基づくものである。つまり、人間が適当にアミノ酸を並べて作った配列をもつポリペプチドの多くは、水溶液中で不溶であるか、溶けても複数のコンフォメーションを取り、特定の構造には折りたたまれない。言い換えると、天然タンパク質のアミノ酸配列は、Anfinsen の仮説が成り立つようにすでに選ばれているのである。これまでに、数多くの天然タンパク質およびその変異体の立体構造が解明されてきたにもかかわらず、天然のタンパク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天然様の構造物性を実現し、それがどのようにタンパク質機能に結びついているのかについては不明な点が多い。そこでこの課題に対し、人間がタンパク質についてもっている知識を総動員して、“はじめから” タンパク質のアミノ酸配列をデザインし、合成・解析を行う「デ

ノボタンパク質設計」の手法が有効となる。このような試みを通して初めて、生物進化に捕われない“アミノ酸配列-立体構造-機能”の関係を浮き彫りにすることができる。

デノボ設計が提唱された 1980 年代初頭から現在までに、さまざまな試みが行われてきた。4 本のヘリックスが束になって形成されるいわゆる 4 本ヘリックスバンドルモチーフに関しては、ヘリックスの車輪モデルを基盤とした、手作業によるデザインが成功している²⁾⁻⁴⁾。しかし、複雑な折りたたみ構造をもつ一般的な球状タンパク質をデザインするためには手作業による方法では限界があるため、計算機を利用した設計も行われてきた。このような研究のうち NMR あるいは X 線結晶構造解析による立体構造の解明にまでいたったのは、Mayo らのジंकフィンガーモチーフの設計⁵⁾が最初で、最近 Baker らの新規構造の設計⁶⁾がこれに続いた。筆者らも、詳細な立体構造決定にはいたらなかったものの、計算機を用いて、ミオグロビンの立体構造をターゲットとした分子設計^{7), 8)}を行い、それらの過程で、デノボ設計で何が比較的容易で何が困難であるか学ぶことができた。本稿では、著者らが最近行った、λ フェージ由来の Cro タンパク質の立体構造に折りたたまれる人工タンパク質設計の研究⁹⁾を紹介し、今後の課題と展望を概説する。

2. λ Cro の立体構造

λ Cro は、古典的な DNA 結合タンパク質で、α ヘリックスと β シートを含むホモダイマーを形成する

De Novo Design of λ Cro Fold

Yasuhiro ISOGAI¹ and Motonori OTA²¹RIKEN Spring-8 Center²Global Scientific Information and Computing Center, Tokyo Institute of Technology

(Fig. 1a). 分離した2つの球状ドメインをもち、各ドメインの同一の配列をもつ α ヘリックスが、34 Åの距離を置いて平行に並んでいる。これら2本のヘリックスがB型DNAの二重らせん中に形成される大きな溝にはまり込むようにして結合する。この構造モチーフは、catabolite activator protein (CAP) や λ リプレッサーと共通しており、DNAとの結合という機能と直接関連する¹⁰⁾。一方、他の部分の構造は、非常にユニークで、2本の逆平行 β ストランドが2つのモノマーを結合しており、一方のサブユニットのC末領域に存在するPhe-58残基が、もう一方のサブユニットの疎水性コアに含まれる。すなわちPhe-58は、各サブユニット間で交換されている。また、 λ Croの安定性は、アミノ酸残基置換の許容度が高い λ リプレッサーやArcリプレッサーと異なり、残基置換に敏感で、多くの部位の点変異により不安定化する¹¹⁾。したがって、 λ Croの立体構造は、設計法を評価するよい指標となる。さらに、 λ Croの安定性とダイマー化、機能メカニズムの相関にはいまだ不明な点が多く残されており、人工的な λ Croの立体構造をつくり、活性を測ってみることは、生物学的にも興味深い。

Fig. 1
Targeted structures of λ Cro and its monomeric variant. These models were drawn with the crystal structures of the natural Cro dimer (5cro) (a) and monomer (1orc) (b), which were derived from PDB. Each subunit of the dimer in (a) is shown by a different color (dark or bright). In (b), the engineered C-terminal region (bright) is also contrasted from the other region (dark). Phe58 in the dimer (a) and the corresponding residue in the monomer (b) are displayed by the CPK rendering.

3. 設計手法

配列設計は、 λ Croのダイマー構造をコンピューターの中に置き、そのおのおのの部位にあてはまるようなアミノ酸を求めることで行った。ここで計算するのはアミノ酸配列と構造のトータルな適合度であり、あらかじめ用意した適合性関数を用いて実行する。適合性関数にはアミノ酸の側鎖の原子座標1つ1つが確定して初めて値を返すような非常に細かいものもあるが、われわれは以下で述べるような粗視化された関数を用いている¹²⁾。

まず、20種類のアミノ酸の構造は典型的な側鎖(ロータマー)だけで表現する。しかも側鎖はそのボリュームに応じた適当な1点を中心とする球で近似する。主鎖に対する側鎖の相対的な位置を決めるのには $C\alpha$ と $C\beta$ のまわりの回転角、 χ_1 アングルの寄与が大きいので、この角度に応じ各アミノ酸あたり3個のロータマーを考慮する。グリシンとアラニンは χ_1 がないので、20個のアミノ酸について計56個のロータマーを考えることになる。ロータマーは56個であるが、同じアミノ酸に割り付けられる3つのロータマーは同じ側鎖球が $C\alpha$ - $C\beta$ 軸の回りを回転しているものだと思えば、ロータマー同士の相互作用は20個の側鎖球の相互作用として表すことができる。このようなモデルに基づき、側鎖球同士の相互作用、側鎖球と水の相互作用、および側鎖球と主鎖局所構造(二次構造)の相互作用を立体構造のデータベースに基づいて統計ポテンシャルとして求め、これを配列-構造の適合性関数とした。また、人工 λ CroがDNAに結合するためには、塩基性の等電点が必要であるため、配列から推定されるpI値が8.5を下回るとペナルティを与える項を関数に加えた。

次に、各部位にくるロータマーを変えながら適合性関数を最適化する(Fig. 2)。最適化手法にはオーソドックスなシミュレーテッドアニーリングを用いた。100万ステップの計算を200回行い200本の配列を得た。上位10本をFig. 3に示す。これらの配列のスコアの差はわずかだったので、ターゲットとした λ Croダイマーの構造に基づいて行った立体構造モデリングの結果、分子量が小さく、側鎖間のぶつかりが少ない4位の配列(sequence number 4, sn4)を実際に合成することにした⁹⁾。また、以上の設計はダイマー構造をもとに行ったが、構造形成とダイマー化を分離して調べるために、DGITQという β ヘアピンとなることが期待される5残基を57部位の後に挿入したモノマー(Fig. 1b)¹³⁾も同時に合成した。

Fig. 2

Scores of designed sequences as a function of steps during simulated annealing. Time series of 10 arbitrary design trials are shown (a). Temperature control during design (b). The sequence was cooled from 550 to 50 K during first 0.5 million steps and it was furthermore cooled very slowly until 10 degrees during next 0.5 million steps. The optimum sequence having the minimal score was collected.

4. 合成と解析

タンパク質は、大腸菌を用いて遺伝子工学的に合成した。合成された人工 Cro ダイマー (sn4) とモノマー

(sn4m) は、それぞれ天然 λ Cro ダイマーおよびモノマー変異体¹³⁾と同様な CD スペクトルを示し (Fig. 4a), 塩酸グアニジンを用いた変性実験においても、典型的な 2 状態転移を示した (Fig. 4b). sn4 および sn4m の変性曲線から得られた変性剤濃度 0 M のときの熱力学的安定性 ($\Delta G_{\text{fold-unfold}}^{\circ}$) は、それぞれ、 -2.2 kcal/mol および -2.5 kcal/mol, $\Delta G_{\text{fold-unfold}}$ の変性剤濃度依存性 (m) は、それぞれ、 1.8 kcal/mol/M および 1.7 kcal/mol/M であった. m 値は、フォールド状態とアンフォールド状態間の溶媒露出表面積の差を示すパラメーターで、フォールディングの協同性を測る尺度となる. 人工 Cro のこれらの値は、50-100 アミノ酸残基からなる小分子量タンパク質の m 値 (0.6 - 2.4 kcal/mol)¹⁴⁾ に匹敵するので、今回設計した人工 Cro タンパク質の双方が、天然様のフォールド特性をもつことを示す. しかし、熱による変性曲線は、天然 λ Cro の熱変性¹³⁾に比べて、協同性の低いものであった (Fig. 4c). これは、フォールド-アンフォールド転移に伴って、比較的小きなエンタルピー変化 (ΔH), すなわち小さな熱容量変化 (ΔC_p) しか起こっていないことを示す.

ゲルろ過クロマトグラフィーおよび分析用超遠心を用いた分子量解析の結果、sn4 は、タンパク質濃度に依存して重合状態が著しく変化した. 一次元プロトン NMR 測定でも、ブロードで低分解のスペクトルを与えた. これらの実験結果は、sn4 は、非特異的な分子間相互作用をしており、より詳細な構造解析が困難であることを示す. 一方、sn4m は広い濃度範囲でモノマーであり、良好な NMR シグナルの分離と分散を示

Fig. 3

Alignment of ten best-scoring sequences with native λ Cro sequence. The scores are indicated in kcal/mol. The hyphens indicate amino acids identical to those of the first sequence. The outlined initial Met was fixed to synthesize the protein in *E. coli*. The outlined two Gln residues at positions 16 and 27, which are important for the DNA binding of native λ Cro¹⁰⁾, were also fixed to functionalize the artificial protein in future designs. The dots above the native sequence (bottom) show the identity of the sequence 4, which was selected to be synthesized, with the native sequence.

Fig. 4

CD spectra and denaturation profiles of designed Cro dimer (sn4) and monomer (sn4m). (a) The thin and bold lines indicate the CD spectra of sn4 and sn4m, respectively. (b) Dependence of the equilibrium between folded and unfolded states on Gd-HCl concentration. The data of sn4 and sn4m are indicated by closed and open circles, respectively. The fractions folded were measured with the CD signal intensity at 218 nm. The denaturation curves of sn4 and sn4m were drawn by fitting to the data, assuming two-state transition with ΔG values of -2.2 and -2.5 kcal mol $^{-1}$, respectively, and m values of 1.8 and 1.7 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$, respectively. (c) Thermal denaturation as followed by CD signal intensity at 218 nm. The thin and bold lines indicate the denaturation curves of sn4 and sn4m, respectively, at protein concentrations of 10 μ M.

した。そこで、多次元 NMR 測定により、sn4m の立体構造解析を行った。解析の結果得られた溶液構造を Fig. 5 に示す。sn4m の平均溶液構造は、ターゲットとした天然の λ Cro モノマー変異体の X 線結晶構造と RMSD 2.1 Å の精度で一致し、ほぼ設計通りの主鎖の折りたたみ構造を示した。得られた NMR 構造からは、天然 Cro 並みの良好なタンパク質コアのパッキング構造が得られているので (Fig. 5a), 塩酸グアニジン変性と熱変性の結果の食い違い (Fig. 4b, c) は、今回の NMR 解析からは得られなかったタンパク質の熱揺らぎなどダイナミックな性質に由来しているものと考えられる。

5. 課題と展望

以上述べたように、私たちは、 60 アミノ酸残基程度からなる天然タンパク質の立体構造を鋳型として、NMR で溶液構造を決定できる程度の構造特性をもつ人工タンパク質を設計する手法を確立することができた。今回設計に使用したポテンシャル関数は、天然タンパク質の立体構造データベースから作成し、ファンデルワールス力やイオン結合など、実在する物理化学的な力を含まない経験的関数である。この点が、Mayo や Baker らによる、物理的に厳密な関数を使う分子設計の成功例とは異なっている。本研究で用いたような経験的ポテンシャル関数^{12), 15)}はモデルの小さ

Fig. 5

Solution structures of designed Cro monomer. (a) The ten energy-minimized NMR structures of sn4m. Each of the ten backbone traces is superimposed on the average structure to minimize the RMSD of the backbone atoms (0.63 Å) and displayed with the hydrophobic residue side chains in pink bars. (b) Comparison between the average solution structure of sn4m and the X-ray crystallographic structure of the natural λ Cro monomer (1orc). The average NMR structure (red) is superimposed on the natural Cro monomer structure (white) with the minimal backbone RMSD of 2.1 Å. (カラー図は電子ジャーナル<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/>参照)

な歪みなどにはロバストであるため、配列と構造の本質的な関係を調べるのに有効だと考えられる。

ダイマーとして設計した sn4 は、設計通りの天然様のダイマー構造をとっていないようであったが、その塩基性の等電点から期待されるように、DNA に対して弱い結合活性を示した。しかし、天然の転写因子が示すような、特定の塩基配列をもつ DNA を認識する特異的結合活性は見いだされなかった。今回得られたモノマーの sn4m の溶液構造に基づいて、フォールディングの協同性や正しいダイマー構造の再設計を行っている。さらに、sn4 を出発クローンとして、特定塩基配列 DNA に結合するクロンのスクリーニングによる実験室進化¹⁶⁾により、機能性デノボタンパク質が得られるかもしれない。また、天然酵素の作用機構（基質の結合と反応の触媒、生成物の解離）を見れば明かなように、タンパク質機能のデザインには、1 Å 以下の分解能で残基を正確に配置する一方で、分子内の比較的遅い構造揺らぎが活性に必須であり、静的な立体構造設計が直接機能の設計につながらない。これが、機能の設計を困難にしている主因である。これらの点を克服するためには、静的な立体構造設計の精度を上げることと同時に構造ダイナミクスを設計する手法を確立することも重要である。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、首都大学東京の伊藤隆教授、理化学研究所の池谷鉄平研究員、城宜嗣主任研究員と共同で行った。ここに深く感謝致します。

文 献

- 1) Anfinsen, C. B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
- 2) Schafmeister, C. E., LaPorte, S. L., Miercke, L. J. and Stroud, R. M. (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 1039-1046.
- 3) Harbury, P. B., Plecs, J. J., Tidor, B., Alber, T. and Kim, P. S. (1998) *Science* **282**, 1462-1467.
- 4) Huang, S. S., Gibney, B. R., Stayrook, S. E., Dutton, P. L. and Lewis, M. (2003) *J. Mol. Biol.* **326**, 1219-1225.
- 5) Dahiyat, B. I. and Mayo, S. L. (1997) *Science* **278**, 82-87.
- 6) Kuhlman, B., Dantas, G., Lreton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L. and Baker, D. (2003) *Science* **302**, 1364-1368.
- 7) Isogai, Y., Ota, M., Fujisawa, T., Izuno, H., Mukai, M., Nakamura, H., Iizuka, T. and Nishikawa, K. (1999) *Biochemistry* **38**, 7431-7443.
- 8) Isogai, Y., Ishii, A., Fujisawa, T., Ota, M. and Nishikawa, K. (2000) *Biochemistry* **39**, 5683-5690.
- 9) Isogai, Y., Ito, Y., Ikeya, T., Shiro, Y. and Ota, M. (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 801-814.
- 10) Takeda, Y., Ohlendorf, D. H., Anderson, W. F. and Matthews, B. W. (1983) *Science* **221**, 1020-1026.
- 11) Pakula, A. A., Young, V. B. and Sauer, R. T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8829-8833.
- 12) Ota, M., Isogai, Y. and Nishikawa, K. (2001) *Protein Eng.* **14**, 557-564.
- 13) Mossing, M. C. and Sauer, R. T. (1990) *Science* **250**, 1712-1715.
- 14) Myers, J. K., Pace, C. N. and Scholtz, J. M. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.
- 15) Jin, W. Z., Kambara, O., Sasakawa, H., Tamura, A. and Takada, S. (2003) *Structure* **11**, 581-590.
- 16) Mossing, M. C., Bowie, J. U. and Sauer, R. T. (1991) *Methods Enzymol.* **208**, 604-619.

磯貝泰弘

磯貝泰弘（いそがい やすひろ）

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
1989 年九州大学大学院理学研究科修了。理学博士。同年理化学研究所生体物理化学研究室研究員、98 年より現職。

研究内容：タンパク質のデザインとフォールディング

趣味：山歩き

連絡先：〒 679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

E-mail: yisogai@riken.jp

太田元規（おおた もとのり）

東京工業大学学術国際情報センター准教授

1996 年早稲田大学理工学研究科後期課程修了（博士（理学））。国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター助手などを経て 2002 年より現職。

趣味：e-Sax を購入したので、リハビリにはげみたいと思っています。

連絡先：〒 152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1-17-5

E-mail: mota@gsc.titech.ac.jp

URL: <http://www.force.gsic.titech.ac.jp>