総説

理想タンパク質構造の設計原理

古賀(巽)理恵, 古賀信康 ワシントン大学生化学科

Protein folding occurs because the native interactions collectively outweigh non-native interactions, resulting in funnel-shaped energy landscapes. The funnel-shaped landscapes of natural proteins are rugged due to evolution for function or neutral drift. We describe an approach to designing ideal protein structures stabilized by consistent local and non-local interactions. The approach is based on rules relating local structures to tertiary motifs, which make possible the design of strongly funneled energy landscapes. Guided by these rules, we succeeded in designing five ideal alpha-beta protein structures with different topologies completely from scratch. These results illuminate how the folding funnels of natural proteins arise.

protein design / folding / ideal protein structures / consistency principle / funnel-shaped energy landscape / design principle

1. はじめに

タンパク質はアミノ酸配列に応じて特異的な立体構造を形成し機能を発揮する。とり得る膨大な数の構造の中から、どのような相互作用によって唯一の天然構造へと折り畳んでいるのだろうか。タンパク質のフォールディング問題は半世紀にわたり多くの研究者を魅了し続けている。

タンパク質は、局所相互作用と非局所相互作用が矛盾なく天然構造を安定化するように設計されている。これは consistency principle と呼ばれ 1983 年に郷によって提唱された¹⁾。また郷は、これを具現化したモデルとして、非天然構造における相互作用を完全に無視し、天然構造における相互作用を形成したときのみ安定化に寄与するという郷モデルを提案し、フォールディングの研究を行った²⁾。

1990 年代に、タンパク質は進化の結果ファネル状のエネルギー地形を持ち、タンパク質はファネルを滑り落ちて行くようにフォールディングする、というファネル理論が Wolynes らによって提唱された³⁾。前述の郷モデルのエネルギー地形を考えると、郷モデルは、天然構造における相互作用のみが安定化に寄与することから、ファネル状のエネルギー地形を持つことがわかる。これにより、90 年代後半から郷モデルを用いたタンパク質のフォールディング研究が盛んに行われるようになった。一方、実験分野では、様々

なタンパク質のフォールディング速度や経路が研究され、とりわけ Fersht らによって開発された ϕ 値解析⁴⁾により、2 状態転移でフォールディングする小さなタンパク質がどのような遷移状態を経由して天然構造へと折り畳むのか調べられた。これらの実験と、郷モデルを用いて得られたフォールディング速度、遷移状態構造を比較した結果、郷モデルは現実のタンパク質のフォールディングをよく記述できるということが明らかになった^{5), 6)}。これにより、2 状態転移でフォールディングする自然界の多くのタンパク質がファネル状のエネルギー地形を持つことが示された。

一方、デザイン研究は、1980 年代後半に DeGrado⁷⁾や Richardson⁸⁾らによるヘリックスバンドルのデザインから始まった。疎水・親水性残基の周期性などのヘリックスの構造特徴を用いてデザインを試みたが、デザインした構造はモルテングロビュールであった。1990 年代後半から計算機を用いたデザインが始まり、いくつかのグループが自然界のタンパク質の主鎖構造を基に側鎖構造を原子レベルでデザインすることに成功した^{9), 10)}。そして、2003 年、Kuhlman らが世界ではじめて、側鎖構造のみならず主鎖構造も含めてデザインすることによって、何も無いところから新規に球状タンパク質構造 Top7 を作ることに成功した¹¹⁾。しかしそれから 10 年、今日に至るまで、彼らを含めた誰もが新規タンパク質のデザインに成功していない。それは Top7 のデザイン研究が、誰もがデザインできるような

Principles for Designing Ideal Protein Structures

Rie TATSUMI-KOGA and Nobuyasu KOGA

University of Washington, Department of Biochemistry

※図 1, 図 2 は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

設計原理を示したわけではないことを示唆している。

どのようにすればある構造へと折り畳む配列をデザインすることができるのか。上記のフォールディング研究を踏まえると、ある構造へと向かうファネル状のエネルギー地形を持つ配列をデザインする必要がある。では、どのようにすればファネル状のエネルギー地形をデザインすることができるのか。われわれは、郷によって提唱された consistency principle を満たした“理想タンパク質構造”をデザインすることによって、ファネル型エネルギー地形を持つタンパク質を容易に得ることができるのではないかと考えた。なぜなら、局所・非局所相互作用が天然構造において無矛盾になるよう構造を設計すれば、それらの相互作用が矛盾する非天然構造においてエネルギーは天然構造よりも不安定になるはずだからである¹²⁾。

本稿では、理想タンパク質構造を設計するための方法・原理を述べるとともに、その設計原理に従ってデザインした5つの理想タンパク質について結果を述べる¹³⁾。また、理想タンパク質の設計原理から見えてくる自然界のタンパク質の設計原理について議論する。

2. 局所構造と非局所構造に関するルール

われわれは、まず局所構造として2次構造パターンに着目し、ある2次構造パターンを形成したときにどのような非局所構造（3次構造モチーフ）が整合して形成されるのかを調べた。具体的には、配列上連続する2個の2次構造要素からなるユニット： $\beta\beta$ 、 $\beta\alpha$ 、 $\alpha\beta$ （ α :ヘリックス、 β :ストランド）を考え、フォールディングシミュレーションおよび自然界のタンパク質構造の統計解析を行うことにより、2次構造パターンと3次構造モチーフの関係性を探った。

フォールディングシミュレーションは、アミノ酸配列の詳細に依存しない粗視化モデルを用いて行った。2次構造要素間のループの長さを変えながら伸びた構造からのフォールディングシミュレーションを行い、どのような3次構造モチーフが高い確率で形成されるのかを調べた。粗視化モデルは、すべての主鎖原子と1個の球で表された“側鎖”（球のサイズはすべての残基で同じ）からなり、エネルギー関数としては、全体をコンパクトにする力、排除体積、主鎖の水素結合のみを考慮し、粗視化された側鎖は排除体積としてのみ扱った。シミュレーションはフラグメントアセンブリ法¹⁴⁾を用いて行い、“指定した2次構造を必ず形成する”という条件の下でどのような3次構造が形成されやすいのかを観測した。その結果、以下に示すような整合

する2次構造パターンと3次構造モチーフに関するルールを発見した。さらに、これらのルールは自然界のタンパク質構造にも見られることがわかった（図1）。

$\beta\beta$ ルール: β ヘアピンのキラリティは、その2つのストランド間にあるループの長さによって決まる（図1a）。ループの長さが2, 3残基の場合はL（左手）のキラリティを持つ構造が、5残基の場合はR（右手）のキラリティを持つ構造が形成されやすい。

$\beta\alpha$ ルール: ヘリックスの位置は、ストランドの最後の残基のプリーツと、ストランドとヘリックスの間のループの長さによって決まる（図1b）。 $\beta\alpha$ ユニット

図1 整合する局所構造（2次構造パターン）と非局所構造（3次構造モチーフ）に関するルール。文献13より改変。

が形成する3次構造モチーフは、ストランドの最後の残基のプリーツ (C α C β ベクトル) に対して、ヘリックスが同じ方向 (P) または逆の方向 (A) に位置するかにより分類できる。ループの長さが2残基のときに P, 3残基のときに A の構造が形成されやすい。

$\alpha\beta$ ルール: ストランドの最初の残基のプリーツはヘリックスに対し反対の方向を向く (図 1c)。 $\alpha\beta$ ユニットが形成する3次構造モチーフは、ストランドの最初の残基のプリーツが、ヘリックスの側を向く場合 (A) とそれとは反対側 (P) を向く場合が考えられるが、ループの長さに関係なく P の構造が形成されやすい。

3. ルールを用いたファネル型地形のデザイン

発見したルールを用いてタンパク質の構造をデザインすれば、ファネル型エネルギー地形を持つタンパク質を容易に得られるはずである。あるトポロジーを持つタンパク質をデザインするとき、ルールに従って2次構造とループの長さを選んで3次元主鎖構造を組み立て、その3次構造を安定にするようデザインすれば、天然構造を安定化すると同時に非天然構造を不安

定化することができる。なぜなら、ルールに従い設定した2次構造パターンが局所的に形成されれば、それとは整合しない3次構造は不安定になるからである。このアイデアを α ヘリックスと β ストランド両方からなる5つの異なるトポロジー (Fold-I ~ V) のタンパク質をデザインすることにより確かめた (図 2)。

デザインの手順を以下に示す。1) デザインするトポロジーについて、ルールに従い2次構造とループの長さを決定し主鎖構造設計図を描く (図 2a)。2) 設定した長さに基づいて、フラグメントアセンブリ法によるフォールディングシミュレーションを行い、主鎖構造を構築する。3) それぞれの主鎖構造に対して、これらを安定にする側鎖構造 (アミノ酸配列) をロタマーを使って探索する¹¹⁾。4) 主鎖および側鎖両方を微小に動かすことによって全体構造を最適化する。5) 3) と 4) の繰り返しをそれぞれの主鎖構造に対して行い、最終的に密な側鎖パッキングが実現されている構造を選ぶ。6) デザインされたアミノ酸配列が設定した2次構造パターンを形成するかどうかを、自然界のタンパク質の統計解析データに基づき予測し、正しく予測された配列を選ぶ。7) デザインされたアミノ

図 2

(a) ルールに従い決定された主鎖構造の設計図。(b) デザイン構造と NMR 構造の比較。RMSD: C α 原子を用いて計算された平均 2 乗偏差。文献 13 より改変。

酸配列について、伸びた構造からの構造予測シミュレーション¹⁵⁾を行うことによりエネルギー地形を探索し、ファネル型エネルギー地形を有していたデザインに対して実験的に折り畳み能を調べる。

4. 実験によるデザインタンパク質の折り畳み能の確認

Fold-I ~ Vについてそれぞれ11個, 12個, 14個, 5個, 12個のデザインの折り畳み能を実験的に調べた。これらのアミノ酸配列は天然には相同な配列がまったくない新規の配列であった。デザインした配列を大腸菌に組み込み、発現、精製を行い、円偏光二色性、サイズ排除クロマトグラフィー、多角度光散乱、NMRを用いて折り畳み能を測定した。その結果、1) 発現、2) 可溶、3) $\alpha\beta$ タンパク質に特徴的な円偏光二色性スペクトル、4) 変性温度が95°C以上、5) 単量体、6) シャープで分散の大きいNMRスペクトル、の6つの条件を満たしたデザインの数は、Fold-I ~ Vについてそれぞれ1個, 4個, 3個, 2個, 1個であった。これらのうち最もシャープで分散の大きいNMRスペクトルを示したデザインをそれぞれのトポロジーから1つ選びNMRにより構造を決定した。解かれたNMR構造は計算機によるデザイン構造とよく一致していた(図2b)。また、グアニジン塩酸塩による変性実験により、デザインしたタンパク質は自然界のタンパク質に見られるように協同的に変性し、その自由エネルギーは5 kcal/mol以上であることがわかった。

ここではじめに紹介したTop7の研究を振り返ると興味深いことがわかる。それはTop7の2次構造とループの長さが、われわれの発見したルールと完全に一致していることである。Top7のデザインが成功した理由は、彼らが筆者らの発見したルールに無意識のうちに従って主鎖構造を設計したことにあると考えられる。

5. おわりに

筆者らは、整合する2次構造パターンと3次構造モチーフに関するルールを発見し、これらのルールに基づいて構造を組み立てることによって、ファネル型エネルギー地形を持つタンパク質を容易に設計できることを示した。これらのルールが自然界のタンパク質の構造においても観測されたことから、自然界のタンパク質のファネル型エネルギー地形も同様の原理により形成されていると考えられる。

今後、本研究でデザインされた理想タンパク質構造のフォールディング研究を行うことにより、タンパク質の折り畳み・デザインのより深い理解につなげていきたいと考えている。

謝 辞

この研究を行ったワシントン大学のDavid Baker博士をはじめとしたBaker研究室の仲間、NMR構造を決定したGaohua Liu博士をはじめとしたNESGグループに感謝します。またこの研究は、古賀信康が日本学術振興会海外特別研究員の支援を受けて行われたものでありここに感謝いたします。

文 献

- Gö, N. (1983) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183-210.
- Taketomi, H. *et al.* (1975) *Int. J. Peptide Protein Res.* **7**, 445-459.
- Onuchic, J. N. *et al.* (1997) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545-600.
- Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, W. H. Freeman & Company, New York.
- Alm, E., Baker, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11305-11310.
- Koga, N., Takada, S. (2001) *J. Mol. Biol.* **313**, 171-180.
- Ho, S. P., DeGrado, W. F. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6751-6758.
- Hecht, M. H. *et al.* (1990) *Science* **249**, 884-891.
- Dahiyat, B. I., Mayo, S. L. (1997) *Science* **278**, 82-87.
- Isogai, Y. *et al.* (2005) *J. Mol. Biol.* **354**, 801-814.
- Kuhlman, B. *et al.* (2003) *Science* **302**, 1364-1368.
- Chikenji, G. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3141-3146.
- Koga, N. *et al.* (2012) *Nature* **491**, 222-227.
- Simons, K. T. *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* **268**, 209-225.
- Rohl, C. A. *et al.* (2004) *Methods Enzymol.* **383**, 66-93.

古賀(翼)理恵

古賀(翼)理恵(こが(たつみ) りえ)

ワシントン大学生化学科博士研究員
2002年大阪大学理学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、生物情報解析研究センター、神戸大学理学研究科、博士研究員を経て、07年より現職。

研究内容: タンパク質の折り畳み、デザイン

連絡先: 3946 W Stevens Wy NE, Box 351655, Seattle, WA 98195, USA

E-mail: rie23@u.washington.edu

古賀信康

古賀信康(こが のぶやす)

ワシントン大学生化学科博士研究員
2006年神戸大学自然科学研究科博士後期課程修了、博士(理学)、神戸大学理学研究科博士研究員、07年よりワシントン大学生化学科 日本学術振興会海外特別研究員を経て、現職。

研究内容: タンパク質構造・機能デザイン

連絡先: 同上

E-mail: nobuyasu@u.washington.edu