

# バイナリーパターン配列デザインによるデノボタンパク質の創出とタンパク質ナノブロックによる超分子複合体の創生

小林 直也・木村 尚弥・新井 亮一\*

## はじめに

タンパク質をはじめとする生体高分子は、生物の長年の進化の産物であり、生命誕生以来、多様な機能性分子やそれらの複合体が生み出されてきた。しかしながら、生物進化によるアミノ酸配列空間の探索プロセスは、地球上における限られた環境バイアスの下での偶然性の積み重ねに過ぎないのではないだろうか。また、各生物はそれぞれ遭遇してきた環境を必死に生き抜くために進化してきたはずであり、おそらく、突然変異と選択の連続によるその場しのぎ的な偶然的試行の繰り返しの結果が分子進化であり、莫大な配列空間を網羅的に隈なく探索できたわけではないだろう。ましてや、各生体分子は人間に利用されるために進化してきたわけではなく、天然タンパク質の構造・機能が必ずしも我々の欲している最適な構造・機能というわけでもないだろう。そこで、天然タンパク質由来の配列によらずに、あえて未踏の配列空間を意図的に人工探索することは、天然にはない新奇な“ネオバイオ分子”の創生が期待されるとともに、タンパク質の構造構築や機能発現の原理的理解に迫り、分子の未知なる潜在能力を引き出すための有力なアプローチの一つではないだろうか。

デノボタンパク質 (*de novo protein*, 新規人工タンパク質) とは、天然タンパク質の配列をもとにせず、新規にアミノ酸配列をデザインした人工タンパク質である。タンパク質やその複合体を人工的にデザインし、望みの構造や機能を自在に創り出すことは、新規な酵素や医薬品の開発、ナノバイオテクノロジーの発展など、生物工学分野をはじめさまざまな関連分野に大きく貢献すると考えられ、タンパク質工学研究の究極的目標である。そこで、ネオバイオ分子創生へのアプローチの一環として、筆者らは、配列パターンデザインにより創出したデノボタンパク質WA20のユニークな2量体構造を解明し、さらに、人工タンパク質をブロックに見立てた超分子複合体の創生などに成功したので紹介したい。

## バイナリーパターン法によるデノボタンパク質の創出

一般に、20種類のアミノ酸をランダムに100残基つなげる場合、 $20^{100} \approx 1.3 \times 10^{130}$  通りもの莫大な配列組

合せがあり、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ランダムに探索することはきわめて困難である。デノボタンパク質の創生において、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、選択するかは本質的な最重要課題であるが、現在でも大変困難な問題である。

これまでに、天然タンパク質配列を基にしないデノボタンパク質の創生は、主に3種類の方法で行われてきた。計算科学的なアプローチにより合理的に設計する方法<sup>1-3)</sup>、ランダムなアミノ酸配列のコンビナトリアルライブラリーから選択する方法<sup>4,5)</sup>、そして、これらの合理的な設計とコンビナトリアルライブラリー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 (semi-rational approach) である<sup>5-7)</sup>。

近年、筆者らは、タンパク質構造構築や機能発現の原理的な理解や応用などを目指して、デノボタンパク質の創出・解析研究に取り組んできた。プリンストン大学のHecht教授の研究室では、半合理的方法であるバイナリーパターン法によりデザインしたアミノ酸配列ライブラリーを用いて、デノボタンパク質を創出する研究が早くから盛んに行われてきた<sup>6,7)</sup>。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本質的特性に着目して、目的タンパク質の二次構造および三次構造に応じて、親水性(極性)アミノ酸(Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lysのいずれか)と疎水性(非極性)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、 $\alpha$ ヘリックスが3.6残基で1周する周期に従って1~3残基ごとに親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の配列パターンをデザインした両親媒性 $\alpha$ 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残基ごとに交互にデザインした $\beta$ ストランド構造を持つデノボタンパク質などが創生されてきた<sup>7)</sup>。Hecht研究室では、このバイナリーパターン法を用いて、4本の両親媒性 $\alpha$ 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デノボタンパク質について、これまで重点的に研究が行われてきた。近年、特に、機能性デ

\*著者紹介 信州大学繊維学部応用生物科学科(准教授) E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp

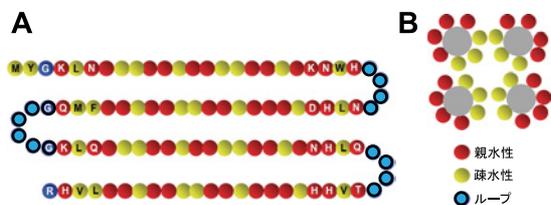


図1. バイナリーパターン法による4本ヘリックスバンドルデノボタンパク質ライブラリーデザイン. (A) バイナリーパターン法によりデザインされた第3世代4本ヘリックスバンドルデノボタンパク質ライブラリー模式図<sup>8)</sup>. 数珠状の各球はアミノ酸残基を表す.  $\alpha$ ヘリックスの周期に従って1~3残基ごとに親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸のパターンをデザインした両親媒性 $\alpha$ ヘリックス4本をループでつなぐように設計. (B) デザインした4本ヘリックスバンドル構造断面の模式図. 4本の両親媒性 $\alpha$ ヘリックスからなるバンドル(束)の内側に疎水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. (米国化学会より許諾を得て, 文献13) Fig. S1を改変して転載 © 2012, ACS.)

ノボタンパク質の創出を目指して, バイナリーパターン配列デザインにより,  $\alpha$ 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デノボタンパク質ライブラリーが作製され(図1)<sup>8)</sup>, 実際に, 酵素様活性を持つデノボタンパク質<sup>8,9)</sup>や, さらには大腸菌株の遺伝子欠損を細胞内で機能的に相補するデノボタンパク質<sup>10-12)</sup>の創出に成功してきた. このデノボタンパク質ライブラリーから獲得した高発現デノボタンパク質クローンの中でも, 比較的構造が安定であり, 変性剤によって2状態転移を示し, 弱い酵素様活性も有するデノボタンパク質としてWA20が創出された<sup>8,13)</sup>.

### デノボタンパク質 WA20の立体構造解析

そこで, 筆者らは, デノボタンパク質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り, WA20の立体構造解析を行った(PDB: 3VJF)<sup>13)</sup>. その結果, 大変意外だったことに, WA20の結晶構造は, デザイン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, 2量体の4本ヘリックスバンドル構造であった(図2). それぞれのWA20単量体は, 40~46残基の長い $\alpha$ ヘリックス2本をループでつないだ“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2分子間でお互いに深く挟み込むように絡み合っており, フォールディングしたドメインスワップ2量体の柱状構造を形成していた. WA20の詳細構造では, 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位置し, 親水性アミノ酸の側鎖は外側に位置していた. 2量体形成の接触面には疎水性残基クラスターのコアが形成されており, さらに塩橋や水素結合も見られた. 単量体の4本

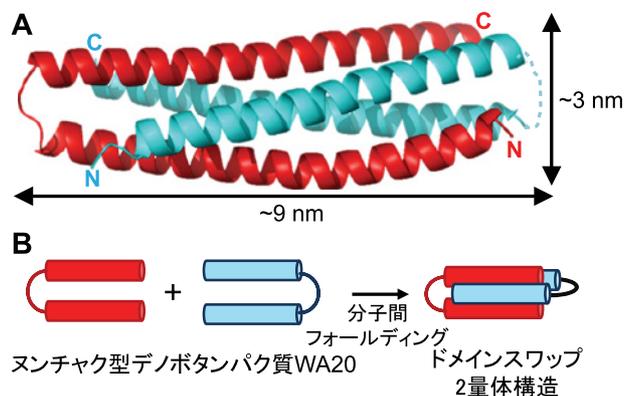


図2. デノボタンパク質WA20の立体構造. (A) X線結晶構造解析により解明したデノボタンパク質WA20の4本ヘリックスバンドルドメインスワップ二量体構造(リボン表示)(PDB: 3VJF)<sup>13)</sup>. (B) 2分子の“ヌンチャク型”構造のWA20がお互いに挟み込むように分子間フォールディングすることにより, ドメインスワップ2量体構造を形成する模式図.

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倍に増加しており, 安定性の要因となっていると考えられた.

以上のようにデノボタンパク質WA20は非常に興味深いヌンチャク型ドメインスワップ2量体構造を形成することに着目し, 次に, このユニークかつシンプルな柱状構造を骨格として, ブロック遊びのように, 幾何学的なナノ構造複合体の構築に利用することを発想した.

### タンパク質ナノブロックによる超分子複合体の創生

生命活動は, タンパク質や核酸, 糖, 脂質といったさまざまな自己組織化能力をもつ生体分子の複合体によって営まれている. なかでもタンパク質は, 複雑で洗練されたナノスケールの超分子複合体構造を形成することで非常に高度な機能を発揮する機能性生体高分子である. このタンパク質複合体を人工的にデザインし, 望みの機能を自在に実現することができるになれば, 医薬品開発やナノテクノロジー, 合成生物学研究分野の発展に大きく貢献できると考えられる. しかしながら, 人工タンパク質複合体のデザインは, 複合体構造形成に多くの相互作用が関係するため非常に複雑で, 現在においても大変困難な課題である. これまでに, 人工的にタンパク質複合体の“かたち”をつくる研究は2000年前後からいくつか行われてきた<sup>14)</sup>. 代表的な研究<sup>15,16)</sup>としては, たとえば, タンパク質複合体の対称性を利用した融合タンパク質のデザインや金属イオンへの配位結合を利用した分子間接触面のデザインにより, 籠型や格子状のタンパク質複合体を作る研究などがある. さらに最近では, 計算科学によってタンパク質間相互作用接触面のアミノ酸残基を高精度にデザインした籠型構造<sup>17)</sup>や2次元格子

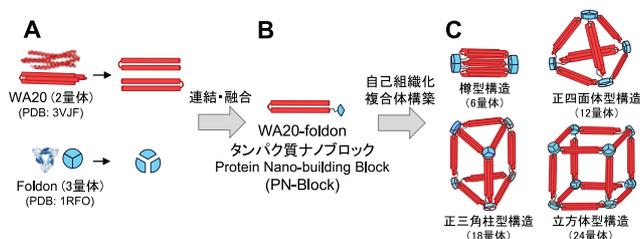


図3. タンパク質ナノブロック WA20-foldon の設計開発および超分子ナノ構造複合体構築<sup>19)</sup>. (A) 2量体形成デノボタンパク質 WA20 と T4 フェージ fibrin の 3 量体形成 foldon ドメインの立体構造 (リボン表示) と模式図. (B) タンパク質ナノブロック (PN-Block) の WA20-foldon 融合タンパク質の設計開発. (C) WA20-foldon による自己組織化超分子ナノ構造複合体構築のデザインモデル. (米国化学会より許諾を得て、文献<sup>19)</sup> Fig. 1 を改変して転載 © 2015 ACS.)

状配列構造<sup>18)</sup>の超分子タンパク質複合体をつくりだす研究も報告されてきた. しかしながら、デノボタンパク質を用いて、いわばブロック遊びのように、少種類のブロックから多様な超分子ナノ構造複合体を創出する研究は、世界でも報告例はほとんどない.

そこで、筆者らは、デノボタンパク質 WA20 の特徴的なヌンチャク型 2 量体柱状構造とタンパク質の自己組織化能力を活かして、WA20 を骨格構造とした幾何学的ナノ構造の超分子複合体を構築することを目的として、“タンパク質ナノブロック (Protein Nano-building Block: PN-Block)” を開発した<sup>19)</sup>. 研究のコンセプトは、おもちゃのブロック遊びのように、少種類の単純かつ規格化された基本ブロックを開発し、それらを組み合わせることで、多様なナノ構造複合体を創出することを基本戦略とした.

**辺と頂点をつくるタンパク質ナノブロック** 先の特徴的な柱状 2 量体デノボタンパク質 WA20 を利用したタンパク質ナノブロック (PN-Block) の第 1 弾として、WA20 を辺として、T4 フェージ fibrin の 3 量体形成 foldon ドメイン<sup>20)</sup> を頂点として見立てて、両者の融合タンパク質 WA20-foldon を設計開発した (図 3)<sup>19)</sup>. WA20-foldon を大腸菌で発現、精製し、native PAGE などにより分析したところ、数種類の複合体 (多量体) 構造を形成していた. これらを分離精製し、サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱 (SEC-MALS) および超遠心分析 (AUC)、小角 X 線散乱 (SAXS) などにより分子量を測定して会合数を求めたところ、各複合体は、それぞれ 6 量体、12 量体、18 量体、24 量体であった. これらは、WA20-foldon がデザイン通りに、お互いに過不足なく幾何学的に組み合わせることで、6 の倍数量体の複合体を安定的に形成することを示唆している (図 3). また、SAXS より得られた 6 量体と 12 量体のナノ構造複合体の概形モデル構造は、それぞれ樽型 (ラグビー

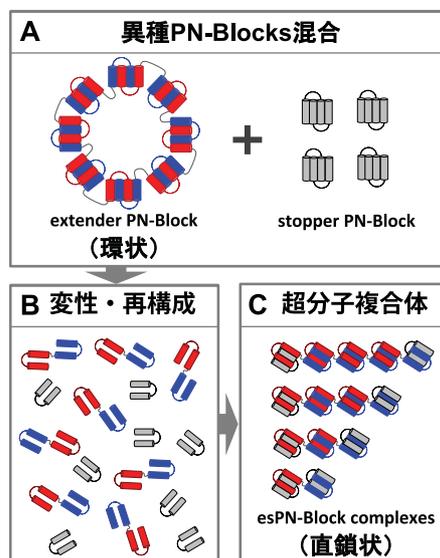


図4. 鎖状伸長構造形成タンパク質ナノブロックの異種再構成による超分子複合体形状変換. (A) デノボタンパク質 WA20 を二つ直列につないだ extender PN-Block (タンデム WA20) と stopper PN-Block (WA20) を混合し、(B) 変性・リフォールディングによって、2 種類の異種 PN-Block 分子をヘテロ再構成することにより、(C) 環状から直鎖状への鎖状伸長構造複合体 (esPN-Block complexes) の超分子複合体形状を変換するプロセスの模式図.

ボール型) 構造と正四面体型 (テトラポッド型) 構造であった<sup>19)</sup>.

**鎖状伸長構造をつくるタンパク質ナノブロック** 次に、PN-Block の第 2 弾として、デノボタンパク質 WA20 をリンカー<sup>21)</sup> を介して 2 個直列につないだ extender PN-Block (タンデム WA20) を開発し、環状の鎖状伸長構造を構築した. さらに、stopper PN-Block (WA20) と混合して、変性リフォールディングをすることにより、2 種類の異種 PN-Block 分子を再構成することに成功し、環状から直鎖状伸長構造への超分子複合体の形状変換を実現した (図 4). さらに、この直鎖状構造体を用いて雲母基板上で金属イオンとともに巨大な自己組織化超分子ナノ構造複合体を構築し、原子間力顕微鏡によって観察した (論文投稿中).

今後、さらに特徴的構造や機能を持つ PN-Block を設計開発し、それらを自在に組み合わせることで、天然タンパク質では実現できないような多様な超分子構造や機能性を持つ人工タンパク質超分子複合体を創生することが期待される.

### 超安定化デノボタンパク質 SUWA の設計開発

一般に、タンパク質は熱や酸・塩基などに弱く変性しやすい性質を持つが、将来ナノマテリアルなどとして幅広く応用展開していくためには、PN-Block を構成する

人工タンパク質の安定化が必要であると考えられる。そこで、さらなる構造安定化を目指して、PN-Blockを構成するデノボタンパク質WA20の立体構造を基盤として、 $\alpha$ ヘリックス形成能<sup>22)</sup>や疎水性コアの増強を合理的にデザインした改変デノボタンパク質SUWA (Super WA20, またはShinshu University Wonderful Artificial protein)を開発した。CD測定による熱変性実験より、WA20の変性温度 $T_m$ は約75°Cであったのに対し、改変体SUWAの $T_m$ は水の沸点をも遥かに超える約120°Cにまで向上したことが確かめられ、大幅な熱安定化を達成した(特許出願中)。いわば、ゆで卵のようにタンパク質は茹でれば変性するという一般的常識を打破するような超安定化デノボタンパク質の開発に成功した。さらに、PN-Blockとして、このSUWAを導入したSUWA-foldonを作製したところ、自己組織化による超分子複合体の構築に成功し、熱変性実験により高い安定性も示された。今後、PN-Blockによるナノマテリアル開発の可能性や応用展開を大きく広げることにつながると期待される。

### おわりに

以上、天然の生体分子の枠を超えた“ネオバイオ分子”創出を目指す研究アプローチの例として、天然タンパク質に由来しない新規な人工タンパク質であるデノボタンパク質をバイナリーパターン法により半合理的に創出する研究から、デノボタンパク質を幾何学的骨格構造としたタンパク質ナノブロック (PN-Block) による自己組織化超分子ナノ構造複合体の創生や、デノボタンパク質の超安定化研究などを紹介した。実際に、これらの研究の過程で、筆者らの予想や期待を超えるようなヌンチャク型2量体構造デノボタンパク質や超分子ナノ構造複合体などに幸運にも遭遇することができたが、これこそが未踏の配列空間に挑むネオバイオ分子研究の醍醐味の一つではないだろうか。さらに、立体構造解析や計算科学などを基盤として合理的デザイン・最適化を進めることは、超安定化デノボタンパク質SUWAの例のように、デノボタンパク質分子の潜在能力を十二分に引き出し、従来の常識をも超えたネオバイオ分子を創生する有効なアプローチであろう。また、これらの一連の成果や近年のタンパク質デザイン分野の発展により、今や、天然タンパク質配列によらずに、一次構造、二次構造、三次構造、四次構造から、さらなる超分子構造(超四次構造)をも生み出すデノボタンパク質複合体の階層的デザインが可能になりつつあることを示唆しており、今後ますます発展を遂げ、天然由来分子を超えるような“ネオバイオ超分子”の創生も期待される。

今後、筆者らもさらに高機能でオリジナルな人工タンパク質ナノブロック (PN-Block) の設計開発を目指して未踏の配列空間に果敢に挑んでいく。たとえば、リガンド依存的に自己組織化が誘導されるPN-Blockや、異種のPN-Blockが特異的に会合するペアPN-Blocks、環境変化に応答して逐次的に自己組織化するPN-Blockなど、さまざまな機能性PN-Blockの設計開発を目指す。さらに、ブロック遊びのように、これらのPN-Blockシリーズ分子群を自在に組み合わせ、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ネオバイオ超分子として、人工タンパク質複合体を創生することにより、タンパク質工学や生物工学分野のみならず、合成生物学やナノテクノロジーなどの広範な研究分野に新たな可能性を切り拓くことが期待される。

### 謝 辞

本研究はプリンストン大学のMichael Hecht教授や信州大学の佐藤高彰准教授をはじめ、多くの方々との共同研究や御協力のもとに行われました。本研究はJSPS科研費 24113707, 24780097, 14J10185, 16K05841, 16H00761や分子研協力研究などの助成を受けました。心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Dahiyat, B. I. and Mayo, S. L.: *Science*, **278**, 82 (1997).
- 2) Kuhlman, B. *et al.*: *Science*, **302**, 1364 (2003).
- 3) Koga, N. *et al.*: *Nature*, **491**, 222 (2012).
- 4) Keefe, A. D. and Szostak, J. W.: *Nature*, **410**, 715 (2001).
- 5) Urvoas, A. *et al.*: *Trends Biotechnol.*, **30**, 512 (2012).
- 6) Kamtekar, S. *et al.*: *Science*, **262**, 1680 (1993).
- 7) Hecht, M. H. *et al.*: *Protein Sci.*, **13**, 1711 (2004).
- 8) Patel, S. C. *et al.*: *Protein Sci.*, **18**, 1388 (2009).
- 9) Patel, S. C. and Hecht, M. H.: *Protein Eng. Des. Sel.*, **25**, 445 (2012).
- 10) Fisher, M. A. *et al.*: *PloS ONE*, **6**, e15364 (2011).
- 11) Smith, B. A. *et al.*: *Protein Sci.*, **24**, 246 (2015).
- 12) Digianantonio, K. M. and Hecht, M. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 2400 (2016).
- 13) Arai, R. *et al.*: *J. Phys. Chem. B*, **116**, 6789 (2012).
- 14) 小林直也, 新井亮一: 生物工学会誌, **94**, 270 (2016).
- 15) Yeates, T. O. and Padilla, J. E.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 464 (2002).
- 16) Lai, Y. T. *et al.*: *Trends Cell Biol.*, **22**, 653 (2012).
- 17) King, N. P. *et al.*: *Nature*, **510**, 103 (2014).
- 18) Gonen, S. *et al.*: *Science*, **348**, 1365 (2015).
- 19) Kobayashi, N. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 11285 (2015).
- 20) Guthe, S. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **337**, 905 (2004).
- 21) Arai, R. *et al.*: *Protein Eng.*, **14**, 529 (2001).
- 22) Pace, C. N. and Scholtz, J. M.: *Biophys. J.*, **75**, 422 (1998).