

氏 名 佐久間 航也

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2283 号

学位授与の日付 2021 年 12 月 31 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Theoretical and experimental studies for de novo design of
“difficult-to-describe” all- α protein structures

論文審査委員 主 査 齊藤 真司
機能分子科学専攻 教授
江原 正博
構造分子科学専攻 教授
青野 重利
構造分子科学専攻 教授
岡崎 圭一
機能分子科学専攻 准教授
長岡 正隆
名古屋大学
大学院情報学研究科 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名：佐久間航也

論文題目：Theoretical and experimental studies for de novo design of “difficult-to- describe” all- α protein structures

これまで多種多様なタンパク質構造が人工設計されてきた。しかしながら、対象を all- α クラスのタンパク質構造に限ってみると、これまで設計されてきた構造は単純なヘリカルバンドルやバレル、あるいはリピートタンパク質などが主である。一方、天然に存在する all- α タンパク質の構造は複雑で多種多様である。例えばグロビンと呼ばれるフォールドは α ヘリックスが不規則にパッキングした立体構造をとり、その発見者によってすら「簡単な言葉では表現できない」と評されている。著者は、天然の all- α タンパク質に近い構造の複雑さを持った人工タンパク質を設計するため、既存の設計方法を解析して欠点を明らかにした上で、新規の設計手法を開発・提案し、さらに設計した人工タンパク質を実験で実証することを目指した。

第1章では、タンパク質設計の研究の背景と問題設定を簡潔に解説した上で、本研究の主眼が「主鎖構造設計」にあることを説明している。

第2章では、小さな3ヘリックスバンドルを題材として、all- α 構造の設計に取り組んでいる。特に、ヘリックスの長さやループのタイプの組み合わせを網羅的に検討し、どの組み合わせがコンパクトな3ヘリックスバンドル構造を生じるのか調査した。その結果、使用したパーツは典型的なループ構造に限られるものの、どのような二次構造の長さの組み合わせがタンパク質らしい球状構造になり得るのかを明らかにした。さらに蛋白質構造設計プログラム・ロゼッタを用いて、これらの主鎖構造に対してアミノ酸配列を設計し、それらがシミュレーションでは狙い通りのトポロジーに折れ畳まると予想されるアミノ酸配列であることを示した。一方で「非典型的」なループモチーフを用いて構築した主鎖構造も用意し、同様にアミノ酸配列を設計したが、これらについては狙い通りに折れ畳まる配列を得ることができなかった。これらの結果から、アミノ酸配列の設計効率を高めるには典型的なループモチーフを使用することが重要であることを明らかにした。また、このようにして数え上げた主鎖構造、およびそれをテンプレートとしてデザインしたアミノ酸配列を公共のデータサーバー上で公開した。今後、他のタンパク質デザイナーが類似のタンパク質を設計しようとする際に参考になるため、本データの公開はタンパク質設計研究分野に貢献するものと考えられる。

第3章では、all- α タンパク質の設計は、既存のフラグメントアッセンブリに基づいた主鎖構築手法では困難があることを明らかにしている。テンプレート構造を用いない、ゼロからの主鎖構築には、ABEGO と呼ばれる粗視化した指標で主鎖の二面角を指定した上で、フラグメントアッセンブリを行う手法 (Blueprint 法) が頻繁に用いられる。しかし、ABEGO は粗視化された指標であるため、異なる二つの構造フラグメントを分離できない場合がある。一例として、本研究では $\alpha\alpha$ -hairpin と $\alpha\alpha$ -corners が共に「GBB」と表現され、同一視されてしまうという問題点を明らかにした。このように ABEGO 表現では異なる二つのフラグメントが分離できないことがあるため、フラグメントライブラリに異なる構造が混在してしまい、主鎖構造構築シミュレーションにおいて単一の主鎖構造に計算が収束しないことがある。著者は、最もシンプルな up-down 型と orthogonal 型のヘリカルバンドルを作成する計算を行い、いずれの場合においても狙いとは異なるミスフォールド構造がドミナントに生じることを明らかにした。このことから Blueprint 法は複雑かつ多様な all- α 構造を設

計するには不適切な手法であり、新規手法の開発が求められると結論づけた。

第4章では、新規主鎖構築方法を開発し、それによって得られた人工タンパク質の物性を実験的に検証した。過去に設計されてきた all- α タンパク質はヘリカルバンドルやバレル、コイルドコイルであり、アルファヘリックスが上下方向に揃った構造を形成している。一方で、天然に存在する all- α タンパク質にはそのような秩序を持たないものも多い。例えばグロビン構造は8本の α ヘリックスが不規則に配置されている。John Kendrew の歴史的なミオグロビン結晶構造の論文においても、その構造は「difficult to describe in simple terms」であると評されている。このような不規則な構造を人工タンパク質でも実現するため、著者はまず all-alpha 構造における秩序を定量化することを行った。ヘリックスの配置の秩序を表現する変数である Helix-Order を定義し、天然の all-alpha タンパク質および既存の all-alpha 設計タンパク質の統計をとった。その結果、既存の設計タンパク質は天然のタンパク質に比べて秩序立っており、複雑性に欠けることが判明した。このことを踏まえて、人工タンパク質に複雑性を与えるような手法を開発した。まず、天然のタンパク質構造を対象に統計をとり、典型的なヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 構造を洗い出した。結果的に、18タイプの構造的に多様な HLH モチーフを抽出することに成功した。次に、これら HLH モチーフと理想的な alpha-helix を用いて、組み合わせ論的に多様な all-alpha 構造を生成し、その中でタンパク質状の球状構造であるものを選び出した。結果的に30万程度の構造が含まれる構造ライブラリが得られたが、その中から特に興味のある(特に複雑さの高い)5つの主鎖構造を選択し、アミノ酸配列をロゼッタを用いてデザインした。この時、選んだ18タイプのループ構造が全て少なくとも1度は使われているように配慮した。設計したアミノ酸配列には Fold_0 Chantal, Fold_0 Elsa, Fold_C Rei, Fold_Z Gogy, Fold_K Massoc, Fold_U Nomur と命名し、合成遺伝子を用いて設計タンパク質を発現・精製した。これらは全て alpha-rich なモノマー構造を取ることが円偏光二色性および Size Exclusion Chromatography combined with Multi Angle Light Scattering (SEC-MALS)の測定結果から判明した。これらのタンパク質は H1-N15 核磁気共鳴分析 (NMR)においてもシャープなピークを示したため、溶液中で明確な立体構造をとっていることが示唆された。NMR を専門とする共同研究者によって上記5つのアミノ酸配列全ての構造において狙ったトポロジーが実現されていることが示された。これらにより本手法によるタンパク質デザインが成功したことが実験的に示された。Fold_0 Elsa については X 線結晶学を専門とする共同研究者によって構造解析が行われ、予想外のドメインスワップ構造を取っていることが明らかになった。

第5章と第6章では、第4章で開発した手法の応用を試みた。第5章では、大量の主鎖構造を生成した上で多様な294構造を選び、それぞれに25種類のアミノ酸配列を設計することで合計7,350配列のアミノ酸配列を持つ人工小型タンパク質ライブラリを構築した。このように極めて多様なトポロジーをエンコードしたライブラリは、機能を持ったタンパク質の設計などに有用であると考えられる。第6章では、第4章で設計した Fold-Z タンパク質の部分構造がグロビンの部分構造に類似していることを見出し、全体としてグロビン構造に類似した主鎖構造2種類を構築した。結果、いずれの主鎖構造においても、計算機上でよくフォールドすると予測される8配列を得ることに成功した。第5章では本手法の生成する構造の多様さに活用の可能性があることを、第6章では典型的な部分構造だけを用いて代表的な「複雑な構造」を構築可能であることを示した。これらの設計タンパク質・タンパク質ライブラリに対する実験的検証は将来の課題として残っている。

第7章では一連の研究を総括し、これまで人工タンパク質が天然のタンパク質の構造より単純であった原因について考察し、本研究が人工タンパク質を設計する上で重要な方法論と知見を与えていると結論づけている。

博士論文審査結果

Name in Full 氏名 佐久間 航也

Title 論文題目 Theoretical and experimental studies for de novo design of “difficult-to-describe” all- α protein structures

これまでに多種多様な人工タンパク質の構造が設計され、合成されている。しかし、 α ヘリックスとループにより構成されている all- α 構造のタンパク質に限定すると、設計された構造は単純な構造が主である。一方、天然に存在する all- α タンパク質は複雑で多種多様な構造をもつ。出願者は、本論文において、天然の all- α タンパク質に近い構造の複雑さをもつ人工タンパク質を設計するために、新規の設計手法を開発・適用し、設計した人工タンパク質を実験で実証する研究を実施した。

第一章では、タンパク質設計の研究の背景と課題を簡潔に説明した上で、本研究では all- α タンパク質の主鎖構造の設計を主題とすることを記述している。

第二章では、小さな 3 ヘリックスバンドルに基づく all- α 構造の設計に取り組んでいる。ヘリックスの長さやループ構造の組み合わせを網羅的に検討し、どのようなヘリックスの長さの組み合わせがタンパク質らしい球状構造になり得るのかを示した。さらに蛋白質構造設計プログラム・ロゼッタを用いて、これらの主鎖構造に対してアミノ酸配列を設計し、それらがシミュレーションでは狙い通りのトポロジーに折れ畳まると予想されることを示した。さらに、アミノ酸配列の設計効率を高めるには典型的なループモチーフを使用することが重要であることを明らかにした。また、この主鎖構造を基盤として設計したアミノ酸配列を公共のデータサーバー上で公開した。

第三章では、all- α タンパク質の設計は、既存のフラグメント集積に基づく主鎖構築手法では困難があることを明らかにしている。テンプレート構造を用いない、ゼロからの主鎖構築には、ABEGO と呼ばれる粗視化した指標で主鎖の二面角を指定して、フラグメント集積を行う手法 (BluePrint 法) が一般的に用いられる。しかし、ABEGO は粗視化された指標であるため、異なる二つの構造フラグメントを分類できない場合がある。出願者は、最もシンプルな up-down 型と orthogonal 型のヘリカルバンドルを形成する計算を行い、主にミスフォールド構造が生成されることを明らかにした。これらのことから BluePrint 法は複雑かつ多様な all- α 構造を設計するには不十分な手法であり、新規手法の開発が必要であることを示した。

第四章では、新規主鎖構築方法を開発し、この方法によって設計した人工タンパク質の物性を実験的に検証している。これまで設計されてきた all- α タンパク質にはヘリカルバンドルやバレル、コイルドコイルがあり、 α ヘリックスが上下方向に揃った構造を形成している。一方、天然に存在する all- α タンパク質は、秩序を持たないものも多い。そこで出願者は、人工タンパク質に複雑性を与える手法を開発した。天然のタンパク質構造を対象に統計をとり、典型的なヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 構造を抽出した。その

結果、18タイプの構造的に多様な HLH モチーフを抽出することに成功した。次に、これら HLH モチーフと理想的な α ヘリックスを組み合わせることで多様な all- α 構造を生成し、その中でタンパク質状の球状構造であるものを選び出した。結果的に30万程度の構造が含まれる構造ライブラリが得られ、その中から特に複雑さの高い5つの主鎖構造を選択し、アミノ酸配列を設計した。さらに、合成遺伝子を用いてこれらの5つの人工タンパク質を発現・精製した。これらは全て α -rich なモノマー構造を取ることが円偏光二色性およびサイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱測定システムの測定結果から判明した。また NMR を専門とする共同研究者によってこれらの5つのアミノ酸配列全ての構造において想定したトポロジーが実現されていることが示された。以上の結果、人工タンパク質の設計が成功したことが実験的に示された。

第五章および第六章では、第四章で開発した手法の応用を行っている。第五章では、大量の主鎖構造を生成した上で多様な 294 構造を選び、それぞれに 25 種類のアミノ酸配列を設計することで合計 7,350 配列のアミノ酸配列を持つ人工小型タンパク質ライブラリを構築している。第六章では、第四章で設計したタンパク質の1つの部分構造がグロビンの部分構造に類似していることを見出し、グロビン構造に類似した主鎖構造2種類を構築している。

第七章では、人工タンパク質が天然のタンパク質の構造より単純であった原因について考察し、人工タンパク質の設計に関する研究について総括している。

以上の研究成果は、人工タンパク質を設計する上で重要な方法論と知見を与えるものである。本学位論文の一部は、既に2報の査読付き国際学術誌に発表されており、さらに1報が BioRxiv により公開されている。その内容は国際的にも一定の水準を満たしていると評価された。

以上により、本論文は博士（理学）の学位授与に値すると審査員全員一致で判断した。