

新規人工設計タンパク質 WA20 の驚きの立体構造を解明

～新奇な“クロスヌンチャク型”二量体構造を解明～

<本研究成果のポイント>

- ・天然にはないアミノ酸配列を新規にデザインした人工設計タンパク質 WA20 の立体構造を X 線結晶構造解析法等により解明
- ・2つの“ヌンチャク型”構造の WA20 タンパク質がお互いにはさみ込むように組み合わさった新奇な“クロスヌンチャク型”（ドメインスワップ4本ヘリックスバンドル）二量体構造を解明
- ・タンパク質の構造構築原理を理解するための基礎研究に寄与すると共に、今後、ナノバイオ分子として利用し、ナノ構造構築やナノバイオフィバー創製への応用も期待

国立大学法人 信州大学繊維学部（濱田州博学部長）は、米国のプリンストン大学との共同研究で、新規人工設計タンパク質 WA20 の新奇な“クロスヌンチャク型”立体構造を解明しました。これは、信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点（拠点長：山沢清人学長、略称：若手拠点）の新井亮一助教を中心とし、繊維学部応用生物学系 生物資源・環境科学課程 新井研究室の応用生物科学専攻修士1年 小林直也、応用生物科学科卒業生 木村曉歩（現：株式会社カイゲン）らと、若手拠点 佐藤高彰助教、米国プリンストン大学 Michael H. Hecht 教授らとの国際共同研究の成果です。

<概要>

タンパク質は生体内で様々な機能や構造を担う非常に重要で高機能な生体物質であり、我々が日々生きていくために必要不可欠なものです。これらのタンパク質を自在にデザインし、望みの機能を実現することができるようになれば、医薬品開発や環境負荷の少ない化学反応、さらにはナノバイオテクノロジーの発展に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ります。しかしながら、天然にない新規人工設計タンパク質^{*1} (*de novo protein* : デノボタンパク質)の創製は、現在においても非常に困難な課題であり、世界中で研究が続けられているものの、安定な構造を持つ新規人工設計タンパク質の創製に成功しているのは、世界でもごく少数のグループに限られています。これまでに、米国プリンストン大学化学科の Michael H. Hecht 教授の研究室(<http://www.princeton.edu/~hecht/>)では、バイナリーパターン法^{*2}を用いた新規人工設計タンパク質の創製に関して先駆的な研究を行ってきました。バイナリーパターン法とは、タンパク質の表面には親水性アミノ酸^{*3}、内側には疎水性アミノ酸^{*4}が配置されるように、アミノ酸の配列パターンをデザインする方法です。これまで、特に数々の4本ヘリックスバンドルタンパク質^{*5}のデザイン及び創製に成功してきました。この中でも、WA20 は、生細胞内で大量生産することができ、熱や変性剤に対する安定性が特に高い新規人工設計タンパク質です。

また、WA20 は、ヘム^{*6}と結合し、弱い酵素^{*7}活性も持っています。しかし、なぜ、WA20 は非常に安定で、ヘム結合性や酵素活性を持つのかなど、詳細については全く分かっていませんでした。

そこで、今回、新井亮一助教を中心とする国際共同研究グループは、この新規人工設計タンパク質 WA20 の立体構造を X線結晶構造解析法^{*8}や小角 X線溶液散乱法^{*9}を用いて解明しました。

驚くべきことに、WA20 の立体構造 (図 1) は、2本の長い α ヘリックス^{*10}が連結した“ヌンチャク^{*11}型”の構造を形成し、このヌンチャク型の WA20 分子 2つ (図 1 の赤色と水色) が、それぞれお互いにはさみこむように組み合わさることで、非常に特徴的で新奇な「ドメインスワップ 4 本ヘリックスバンドル二量体構造^{*12}」、言わば、「“クロスヌンチャク型” 二量体構造」を形成することを世界で初めて明らかにしました。また、溶液中の WA20 の分子量は、二量体に相当する約 25kDa と判明し、溶液中の立体構造も結晶構造解析で見出された二量体構造と事実上一致しました。

本研究成果により、タンパク質の構造構築原理を理解するための基礎研究に貢献すると共に、今後、この WA20 の立体構造特徴を活かしたナノバイオ分子^{*13}を作製し、ナノ構造構築やナノバイオファイバー創製への応用も期待されます。

本研究は、文部科学省テニュアトラック普及・定着事業 (若手研究者の自立的な研究環境整備促進事業) の「信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点」の一環として、科学研究費補助金や日本学術振興会の海外特別研究員制度などの支援も受けて行われました。また、X 線回折データは大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の放射光科学研究施設フォトンファクトリーを利用して取得しました。

本研究成果は、米国化学会の学術論文誌『The Journal of Physical Chemistry B』の Harold A. Scheraga Festschrift^{*14} (記念論文特集号) に掲載されるに先立ち、Web 速報版 (3月8日付) (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp212438h>) に掲載されました。さらに、WA20 の立体構造座標データは、Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) を通して世界に公開されます (PDB ID: 3VJF)。

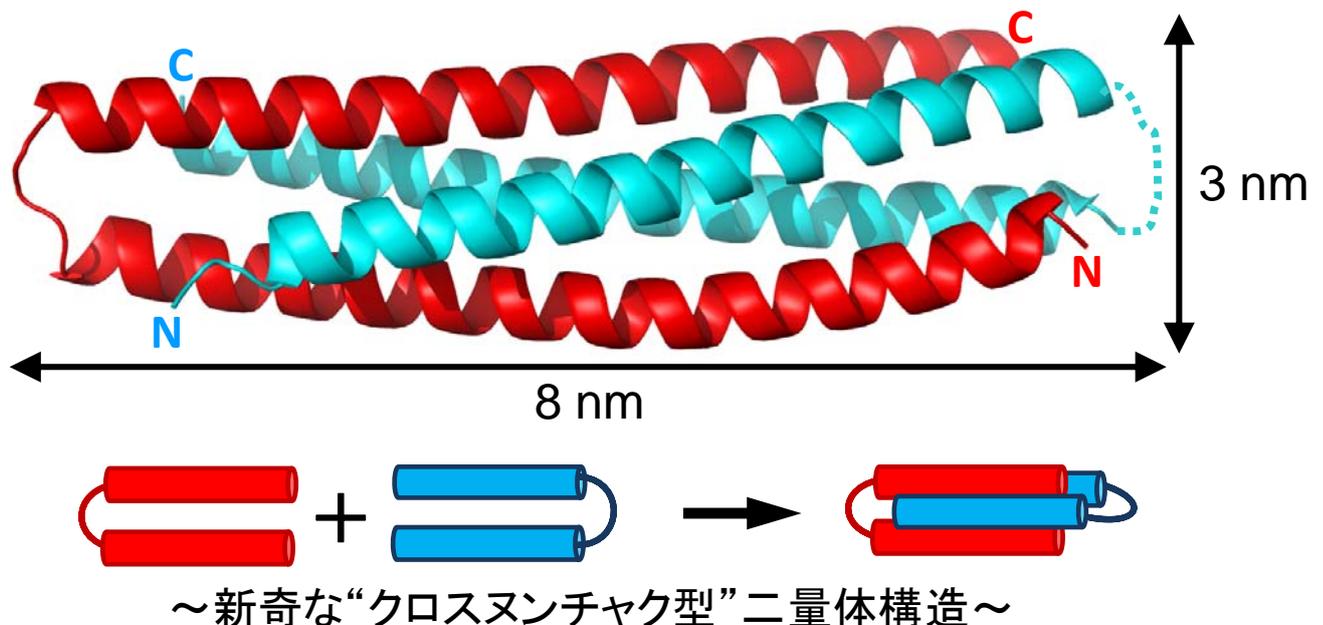


図1 新規人工設計タンパク質WA20の立体構造

<解説>

1. 背景

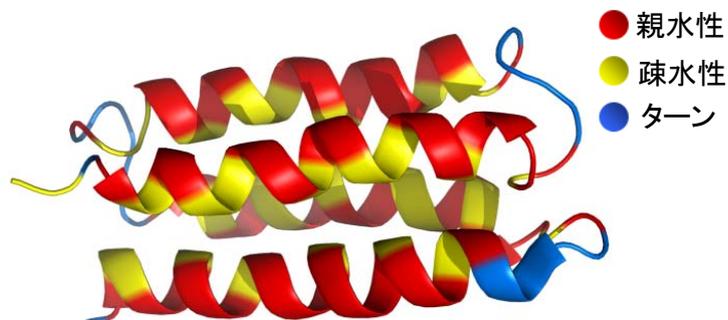
タンパク質は、20種類のアミノ酸が順番に一直線に連結した生体高分子であり、生体内で様々な機能や構造を担う非常に重要で高機能なナノスケール（1 nm は 1 mm の 100 万分の 1）の物質で、我々が日々生きていくために必要不可欠なものです。これらのタンパク質の働きに異常が発生すると病気を引き起こす原因にもなり、また、病気を治すためにも様々なタンパク質の働きが必要です。さらに、生体内で様々な代謝反応を行うために、温和な生体条件下で効率よく反応を触媒する酵素タンパク質が働いており、これを工業的に応用することができれば、環境負荷の少ない化学反応プロセスを構築できる可能性があります。そこで、これらのタンパク質を自在にデザインし、望みの機能を実現することができるようになれば、医薬品開発や環境負荷の少ない化学反応、さらにはナノバイオテクノロジーの発展に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ります。

しかしながら、一般に 20 種類のアミノ酸をランダムに 100 残基並べた場合、 20^{100} = 約 1.3×10^{130} 通りもの莫大な組み合わせがあり、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ランダムに探索することは極めて困難であります。そこで、新規人工設計タンパク質(*de novo protein* : デノボタンパク質)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、選択するかがとても重要ですが、現在でも非常に困難な課題であり、世界中で研究が続けられているものの、安定な構造を持つ新規人工設計タンパク質の創製に成功しているのは、世界でも未だごく少数のグループに限られています。これまでに、米国のプリンストン大学化学科 Michael H. Hecht 教授の研究室(<http://www.princeton.edu/~hecht/>)では、バイナリーパターン法を用いた新規人工設計タンパク質の創製に関する先駆的な研究を行ってきました。バイナリーパターン法とは、タンパク質の表面には親水性アミノ酸、内側には疎水性アミノ酸が配置されるように、目的とする立体構造に応じて、アミノ酸の配列パターンをデザインする方法です。

例えば、 α ヘリックスが 3.6 残基毎に 1 回転することに着目し、3 もしくは 4 残基ごとに疎水性アミノ酸を配置し、その他の領域には親水性アミノ酸を配置することにより疎水性残基を縦一列に並べます。さらに、その α ヘリックスを 4 本束ね、内側に疎水性領域を形成し、各ヘリックスをターン構造でつなぎ合わせることで、4 本ヘリックスバンドル構造タンパク質のデザイン及び創製に特に成功してきました (図 2)。この中でも、WA20 は生細胞内で大量生産することができ、熱や変性剤に対する安定性が特に高い新規人工設計タンパク質です。WA20 は、ヘムと結合し、弱い酵素活性も持っています。しかし、なぜ、WA20 は非常に安定で、このような酵素活性を示すのかなど、詳細についてはこれまで全く分かっていませんでした。



バイナリーパターン人工設計タンパク質配列ライブラリー



新規人工設計タンパク質S-824立体構造 (PDB ID: 1P68)

図2 バイナリーパターン法による人工タンパク質デザイン

2. 研究手法と成果

タンパク質の構造や機能などの詳細を解明するためには、原子レベルでタンパク質の立体構造を解析する必要があります。そこで、新井亮一助教を中心とした国際共同研究グループは、この新規人工設計タンパク質 WA20 の立体構造をX線結晶構造解析法により解明することを目指して、WA20 の結晶化に5年以上前から地道に取り組んできました。はじめの数年間には構造解析可能な良質の結晶はなかなか得られませんでした。応用生物科学科4年生（当時）の木村暁歩（平成22年3月卒業、現在株式会社カイゲン勤務）によるWA20の精製及び結晶化実験の直向きな努力により、ついに構造解析可能な良質の結晶作製に成功しました（図3）。これらの結晶を用いて、つくば市にある高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設 フォトンファクトリー（Photon Factory, BL-5A）において、単結晶X線回折実験を行い、若手拠点新井亮一助教と応用生物科学専攻修士1年松尾京子により、WA20の立体構造を原子レベルで解明しました。

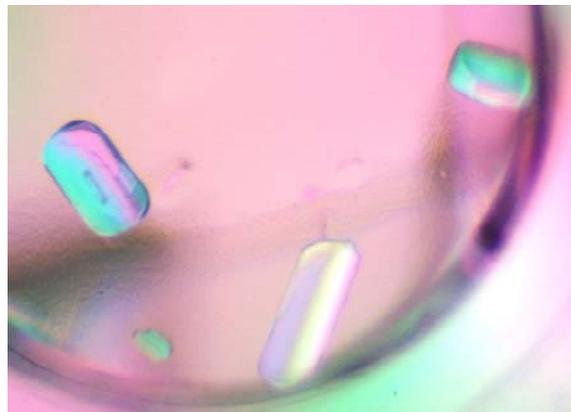


図3 WA20タンパク質の結晶

その結果、驚くべきことに、WA20は、当初予想していた図2のような単独の1分子からなる4本ヘリックスバンドル構造ではなく、2本の長い α ヘリックスが連結した“ヌンチャク”のような形状をとり、このヌンチャク型のWA20分子2つ

（図1及び図4の赤色と水色）が、それぞれお互いに挟みこむように組み合わせることで、非常に特徴的で斬新な「ドメインスワップ4本ヘリックスバンドル二量体構造」、言わば、「クロスヌンチャク型」二量体構造」を安定的に形成することを世界で初めて明らかにしました。また、立体構造の表面を詳細に調べたところ、2つの比較的大きなポケット（穴）が見つかり（図4）、これらが基質^{*7}結合部位として働いて弱い酵素活性を示す可能性が示唆されました。

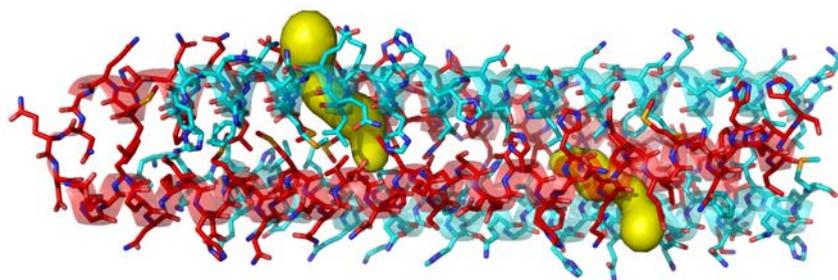


図4 WA20の立体構造上のポケット(黄色)部位
(酵素の基質結合部位として働く可能性)

さらに、応用生物科学専攻修士1年小林直也による生化学・物理化学実験や若手拠点佐藤高彰助教による小角X線溶液散乱実験により、WA20の構造は溶液中でも安定であり、その分子量は二量体に相当する約25 kDaと判明し、溶液中の構造も結晶構造解析で見出された二量体構造と事実上一致しました。

これらの新規人工設計タンパク質に関する新奇な発見や解析結果は、タンパク質の構造構築原理を理解するための基礎的研究に寄与すると考えられます。

3. 今後の期待

今後、このWA20の特徴的なクロスヌンチャク型二量体構造を活かし、ナノスケールのブロックパーツとしての応用を検討していく予定です。例えば、図5のように、WA20を連結したナノバイオ分子を作製し、新奇なナノ構造構築や自己組織化ナノバイオファイバー創製への応用展開が考えられ、将来のナノバイオテクノロジーの発展に大きく貢献することが期待されます。

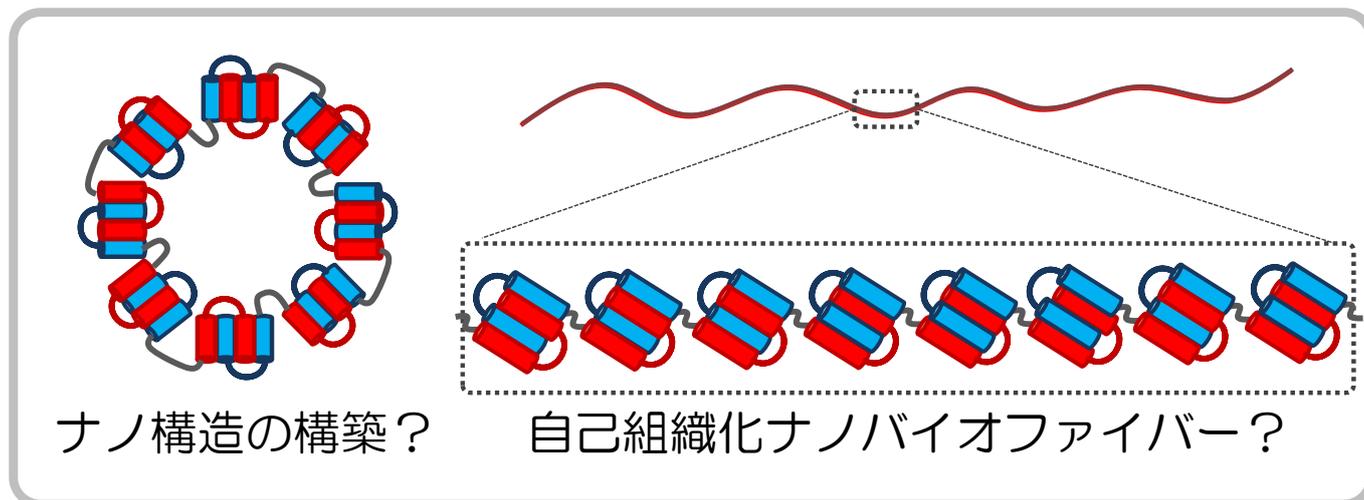


図5 WA20の立体構造特徴を活かしたナノバイオ分子の創製 ～ナノ構造構築やナノバイオファイバー作製への応用展開が期待～

本研究関連成果により、新井亮一助教は、昨年5月に IX European Symposium of The Protein Society (Stockholm, Sweden)において The Protein Science Young Investigator Travel Grant/The Protein Society Finn Wold Travel Award を受賞し、さらに、昨年10月に Protein Data Bank 40th Anniversary Symposium (Cold Spring Harbor, NY, USA)において PDB40 Travel Award を受賞致しました。

本研究は、文部科学省テニュアトラック普及・定着事業（若手研究者の自立的な研究環境整備促進事業）の「信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点」の一環として、また、科学研究費補助金（新学術領域「天然変性蛋白質」（領域代表：佐藤衛 横浜市大教授）の公募研究（研究代表者：新井亮一）、他）や日本学術振興会の海外特別研究員制度（新井亮一、派遣先：米国プリンストン大学（2006～2007年））などの支援も受けて行われました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

<発表論文情報>

The Journal of Physical Chemistry B, 2012, in press, (Special issue: Harold A. Scheraga Festschrift)
Domain-Swapped Dimeric Structure of a Stable and Functional *De Novo* Four-Helix Bundle Protein, WA20

Ryoichi Arai,^{*,†,‡,§} Naoya Kobayashi,[§] Akiho Kimura,[§] Takaaki Sato,[†] Kyoko Matsuo,[§] Anna F. Wang,[‡] Jesse M. Platt,[‡] Luke H. Bradley,^{‡,||} and Michael H. Hecht^{*,‡}

[†]International Young Researchers Empowerment Center, Shinshu University,
Ueda, Nagano 386-8567, Japan

‡Department of Chemistry, Princeton University, Princeton, New Jersey 08544, United States

§Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386-8567, Japan

||Departments of Anatomy & Neurobiology, Molecular & Cellular Biochemistry, Center of Structural Biology, University of Kentucky College of Medicine, Lexington, Kentucky 40536, United States

*Corresponding Author

DOI: 10.1021/jp212438h

<用語説明>

※1 新規人工設計タンパク質

天然タンパク質のアミノ酸配列をもとにしないで、新規に配列を設計した人工タンパク質。英語で *de novo protein* ということより、「デノボタンパク質」とも呼ぶ。

※2 バイナリーパターン法

バイナリーパターン法とは、タンパク質の表面には親水性アミノ酸、内側には疎水性アミノ酸が配置されるように、目的とする立体構造に応じてアミノ酸の配列パターンをデザインし、半合理的(semirational)に新規人工設計タンパク質を創製する方法である。(特に、親水性(極性)、疎水性(非極性)の2つの性質に着目してアミノ酸配列パターンをデザインすることより、バイナリー(2成分)パターン法と呼ばれる。)プリンストン大学化学科の Michael H. Hecht 教授が中心になって考案した。(参考文献: Hecht, M. H.; Das, A.; Go, A.; Bradley, L. H.; Wei, Y. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1711–1723.)

※3 親水性アミノ酸

水(H₂O)に対して親和性を示す極性の側鎖を持つアミノ酸。水によくなじみ、水に溶けやすい性質を持つ。代表的なものは、荷電アミノ酸のアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リシン(リジン)、ヒスチジンや、中性アミノ酸のセリン、トレオニン(スレオニン)、システイン、アスパラギン、グルタミンなどである。水に溶けているタンパク質においては、タンパク質の表面上に、水とよくなじむ親水性アミノ酸が多く存在している。

※4 疎水性アミノ酸

水に対する親和性が低い非極性の側鎖を持つアミノ酸。水に比較的溶解しにくく、油のように水となじみにくい性質の側鎖を持つ。代表的なものは、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリンなどである。水に溶けているタンパク質においては、水を避けるように、タンパク質の内側中心部に疎水性アミノ酸が集中し、疎水性アミノ酸同士の相互作用によりタンパク質の立体構造の安定性に重要な役割を果たしている。

※5 4本ヘリックスバンドルタンパク質

4本の α ヘリックス^{※10}を束ねた(bundle)形状の立体構造を持つタンパク質。図2の下段の新規人工タンパク質 S-824 の立体構造がその典型的な構造。疎水性残基を内側に配して4つのヘリックスが疎水性相互作用で安定化している例が多い。天然にも広く存在し、比較的単純な構造であることから、新規人工設計タンパク質のデザインターゲット構造としても用いられることも多い。

※6 ヘム

鉄原子とポルフィリンから成る錯体。生体中で、ヘモグロビン、ミオグロビン、ミトコンドリアの電子伝達系（シトクロム）、薬物代謝酵素（P450）、カタラーゼ、一酸化窒素合成酵素、ペルオキシダーゼなどの様々なヘムタンパク質の補欠分子族として働いている。

※7 酵素、基質

酵素は、生体でおこる化学反応に対して触媒（特定の化学反応の反応速度を速める物質で、自身は反応の前後で変化しないもの）として機能するタンパク質である。酵素は、消化・吸収・代謝などの生体内のあらゆる反応過程に関与しており、生きるために必要不可欠なタンパク質である。また、酵素によって化学反応の触媒作用を受ける化合物や分子を基質と呼ぶ。

※8 X線結晶構造解析法

物質の三次元(立体)構造を決定するための実験的な手法の一つ。物質の結晶にX線を照射して得られる回折パターンデータをもとに計算及びモデル構築を行い、物質の立体構造を決定する。タンパク質の立体構造を原子レベルで求める代表的な方法の一つである。X線結晶構造解析法で立体構造を求めるためには、良質な単結晶を作ることが非常に重要なポイントとなる。

※9 小角X線溶液散乱法

X線を溶液状態の物質に照射して散乱されるX線のうち、散乱角が小さいもの($< \sim 10^\circ$)を測定することにより 1~100 nm スケールの微細構造に関する情報を得る手法。溶液中のタンパク質の構造や分子量を推定する目的にもよく用いられる。

※10 α ヘリックス

タンパク質の立体構造を構成する基本的な共通骨格構造の1つで、バネに似た右巻きらせん形状をしている(図1参照)。骨格となるアミノ酸のアミノ基は4残基離れたカルボニル基と水素結合を形成し、構造を安定化している。

※11 ヌンチャク

琉球古武術で用いられる武器の一つ。形状は2本の同じ長さの棒を紐や鎖で連結したもの。振り回して相手を殴打したり、棍棒として「打ち」や「突き」としても用いられる。(Wikipedia 参照)

※12 ドメインスワップ4本ヘリックスバンドル二量体構造

“ドメインスワップ”とは、複数のタンパク質分子が、お互いに部分的に絡み合うように、他の分子の構造の一部分をあたかも自らの分子の構造の一部分として取り込むように折り畳みながら、多量体(複数の分子が集まって形成される複合体)を形成することを表す専門用語である。「ドメインスワップ4本ヘリックスバンドル二量体構造」とは、図1のWA20の立体構造のように、2本の長い α ヘリックスが連結した“ヌンチャク”型のWA20分子2つ(図1の赤色と水色)が、お互いにはさみこむように絡み合いながら(“クロス”しながら)組み合わせることで、全体として4本の α ヘリックスを束ねた(bundle)形状の二量体(2つの分子が組み合わせられて形成される複合体)の立体構造を表現する専門用語である。今回、より一般的にわかりやすい例えとして、このような構造を“クロスヌンチャク型”二量体構造」とも表現した。

※13 ナノバイオ分子

ナノスケール（1 nm は 1 mm の 100 万分の 1）の大きさの生体分子であり、タンパク質や核酸はその代表的なものである。ここでは特にナノバイオテクノロジーへの応用を目指して人工的に改変・作製したものをナノバイオ分子と呼んでいる。ナノバイオテクノロジーとは、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーが融合した技術領域である。幅約 2 nm の DNA・RNA 分子や、大きさが 10 nm 程度のタンパク質分子などのバイオ分子(生体高分子)は、生命現象を担うナノマシンである。ナノバイオ分子は精巧な認識能力、均質性、自己集合性などの特徴を示し、このようなナノマシンは、現在の工学技術では製造不可能であり、ナノバイオテクノロジーは新しい技術分野となりうる。病気の診断や治療などの医療分野、環境汚染モニタリングなどの環境分野、化学・電子材料分野などで盛んに研究が進められている。

※14 Harold A. Scheraga Festschrift

Dr. Harold A. Scheraga は、長らく、米国コーネル大学教授で、生体高分子の物理化学研究、特にタンパク質の折り畳み（フォールディング）に関する研究等での世界的先駆者・第一人者である(HP: <http://www.chem.cornell.edu/has5/>)。生涯論文数は 1270 報を超える超一流の研究者であり、90 歳を迎えた今も研究を続けている。世界中で活躍する弟子を数多く輩出しており、今回、その弟子たちが中心となって、Scheraga 教授の 90 歳記念の Festschrift（記念論文集）を米国化学会の学術論文誌 The Journal of Physical Chemistry B 上に特集号として出版することを企画し、本論文は、その中の一つとして掲載される（なお論文掲載の可否を決定する審査(peer review)は、通常の Journal of Physical Chemistry B へ投稿された論文の審査と同様のプロセスで厳格に行われた）。（因みに、今回の共同研究者のプリンストン大学 Hecht 教授は Scheraga 教授の直弟子であり、新井助教は 2006～2007 年に博士研究員（ポスドク）として、Hecht 教授に師事しており、言わば、Scheraga 教授の孫弟子にあたるともいえる。）

（問い合わせ先）

信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点
信州大学繊維学部 応用生物学系 生物資源・環境科学課程
助教 新井 亮一
〒386-8567 長野県上田市常田3-15-1
TEL&FAX: 0268-21-5881
E-mail: rarai@shinshu-u.ac.jp
HP: <http://bs.shinshu-u.ac.jp/arai/index.html>

（報道担当）

信州大学 繊維学部 研究支援担当 東間
〒386-8567 長野県上田市常田3-15-1
TEL: 0268-21-5309, FAX: 0268-21-5317
E-mail: touma_yo@shinshu-u.ac.jp
HP: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/textiles>

※ 本資料の鮮明なカラー版をメール等でご提供できますので、必要な方は、上記までご一報ください。