

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370074

研究課題名(和文)蛋白質の構造機能要素の抽出と応用の為の基盤整備

研究課題名(英文)Extraction and application of structural and functional elements of proteins.

研究代表者

上久保 裕生(Kamikubo, Hironari)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授

研究者番号：20311128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質は最も多様性にとみ、高い機能性を示す分子である。ライフサイエンスの研究分野は言うに及ばず、近年では医薬品への応用などより身近な存在になりつつある。しかしながら、我々は未だ、蛋白質を自在に設計し、望みの機能を実現する手法を手にしていない。本研究では、蛋白質の基本部品(エレメント)の同定を試み、その応用可能性を検討してきた。その結果、エレメントの組み替えによって蛋白質の機能を自在に改変できる可能性を見いだすことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Nowadays, artificially engineered proteins are utilized in various life science areas. In addition, engineered proteins are known to be one of promised candidates for next generation drugs. However, effective methods for rational design of artificial proteins have not been developed. Using comprehensive alanine insertion mutation analysis, we have revealed that regions of several subsequent amino acid residues in a protein, named as "Element", are responsible for the function and structure. In this work, we established a working hypothesis that those elements act as building blocks in the proteins, and verified it. In the result, by implanting the elements from a protein into another protein with a different function, we successfully modified the protein function as we wish. This success implies that the elements act as a kind of building-block to mediate a particular protein function, and will enable us to design an artificial protein rationally.

研究分野：生物学

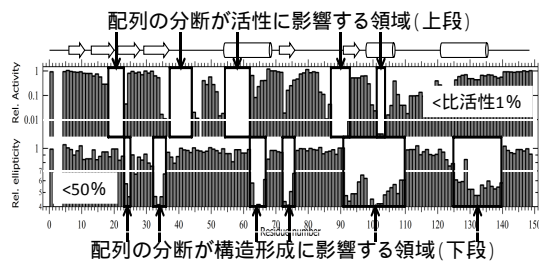
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質工学 分子設計 フォールディング 酵素

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、特定のアミノ酸が並ぶことによって初めて蛋白質としての特徴を示すようになる。この事実は、物質としての基本単位がアミノ酸 1 残基であるものの、蛋白質らしさを司る、配列の連続性を反映した基本単位が存在することを示唆している。

蛋白質構造予測法の中で、高い予測率を示すアルゴリズムの一つに、Fragment assembly 法があげられる。このアルゴリズムでは、予測対象のアミノ酸配列を 10 残基程度の Fragment に分割し、Fragment ごとに予測した構造を組み合わせ、最適化することによって全体構造を予測する。この手法の成功は、連続する 10 残基程度の配列の中に、構造を司る情報が暗号化されていることを暗に示している。しかしながら、その暗号がどのように一次配列上に記述されているのかは明らかにされていない。申請者は、配列の連続性に注目し、アラニン残基を挿入することによって配列を分断し、その効果が構造や機能に与える影響を調べてきた(網羅的アラニン挿入変異解析)。その結果、配列の分断が構造や機能に著しい影響を与える領域は、数残基から 10 残基程度の連続した領域を形成し、そのような領域が蛋白質中に複数存在することを明らかにしてきた。さらに、複数の蛋白質に対して、網羅的アラニン挿入変異解析を適用した結果、このような領域が蛋白質一般に存在することが明らかとなった。



2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、網羅的アラニン挿入変異解析によって抽出された領域が、構造や機能を司る基本単位(エレメント)であるとの作業仮説に基づき、この仮説の検証、並びに、エレメントを用いた蛋白質工学実現のための基盤整備を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、仮説の検証、並びに、蛋白質工学的応用を目的として、機能が異なるものの、類似した構造を示す 2 つの蛋白質に注目し、(1) 構造に関するエレメントの位置保存性の検証、並びに、(2) 機能に關与する領域の移植による機能改変の可能性を検証した。

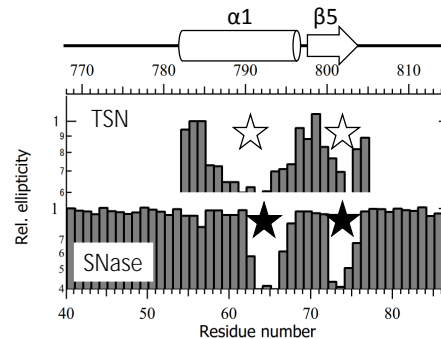
研究開始時に、すでに構造エレメント・機能エレメントを同定していた黄色ブドウ球菌由来の核酸分解酵素(SNase)に加え、本研究では、SNase と類似構造を示し、異なる

機能を有する、ヒト由来転写調節因子 p100 蛋白質の C 末端ドメイン(TSN ドメイン)をモデル蛋白質として選択した。TSN ドメインの結晶構造はすでに報告されており、配列一致度は 15% にもかかわらず、SNase と類似した構造に、90 残基程度のドメイン(Tudor ドメイン)が挿入された構造を有している。(1) の構造エレメントの位置保存性を検証するために、TSN ドメイン(TSN)の発現・精製系を構築し、TSN に対して網羅的アラニン挿入変異解析を行った。さらに、(2) のエレメントの移植による機能改変の検証を目的とし、SNase の機能エレメントを TSN に移植した人工蛋白質を作製し、その核酸分解活性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 構造エレメントの位置保存性

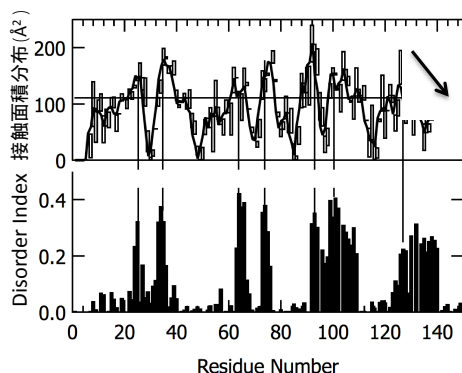
図に、TSN 並びに SNase に対して行った網羅的アラニン挿入変異解析の 1 から 5 に至る領域の結果を示している。縦軸は天然状態の円偏光二色性(CD)とアラニン挿入変異体の CD の相対値を示している。SNase では、65 残基周辺、73 残基周辺にアラニンを挿入すると著しく天然構造が失われ、この領域が



構造エレメントであることを示している。TSN でも、その長さは異なるものの、類似した領域に構造エレメントが存在していることがわかる。この結果から、配列保存性が低くても、類似した立体構造を有する蛋白質の間では構造エレメントが類似した場所に保存されていること(構造エレメントの位置保存性)を示すことができた。

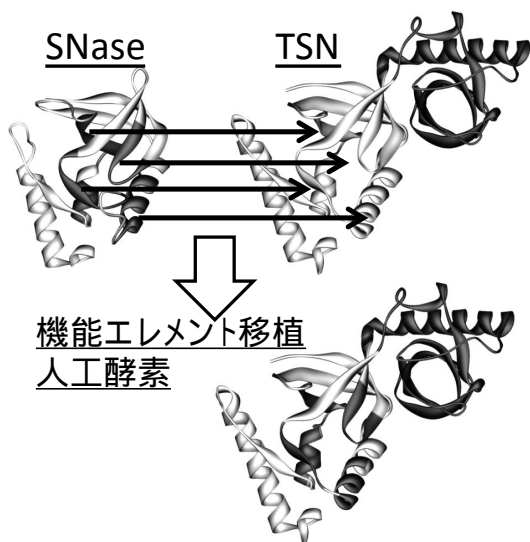
構造エレメントを規定する要因を明らかにするために、アミノ酸の性質や立体構造を指標とした各種パラメータと比較したところ、構造エレメントに位置するアミノ酸残基は、他の領域と密に接触し、単位アミノ酸残基あたりの接触表面積が高くなっていることがわかった。次ページの図は、接触表面積分布とアラニン挿入による蛋白質の変性度の比較を示している。図から明らかのように、構造エレメントに位置するアミノ酸は例外なく高い接触表面積を示している。ここでは示さないが、先に示した、TSN と SNase の構造エレメントの長さの違いも、接触表面積分布で説明することができた。以上の結果より、網羅的アラニン挿入変異解析によって同定される構造エレメントは、分子内の接触密度

によって規定されていることが示唆された。



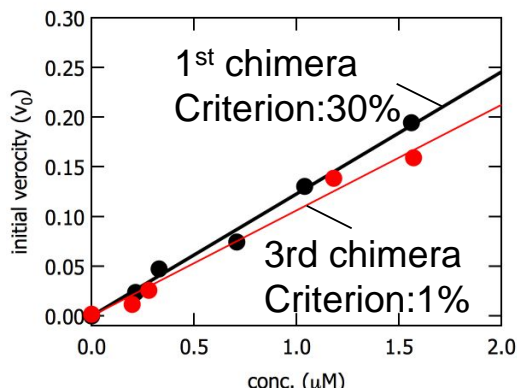
(2) 機能に関する領域の移植による機能改変の可能性

SNase では、機能に関するエレメントが 5 つ同定されている。しかし、現在まで機能エレメントを決める閾値については検討されてこなかった。そこで、本研究では、野生型との比活性を指標として、30%と 1%を閾値として機能エレメントを再定義し、これらの機能エレメントを下図のように、TSN の立体構造上、SNase の機能エレメントが存在する位置に移植した人工蛋白質を設計し作製した。



いずれの人工蛋白質でも、TSN が本来示さない、核酸分解活性を示すことが明らかとなった。興味深いことに、1%を閾値とした場合、30%を閾値とした場合、いずれの条件においても、同程度の核酸分解活性を示すことが明らかとなった。30%を閾値とした場合には、全配列に対し 56%の領域を移植する必要があったのに対して、1%を閾値とすることで 23%の領域を移植するだけで、機能を再現することができた。以上の結果から、機能エレメント抽出の基準が実験的に見積もることができただけでなく、機能エレメントの移植によって、機能そのものを移植することが可能であることが実証された。この実験結果は、機能エレメントが機能を司る基本部品であり、原理的には、これらの領域のみによって機能が実現されていることを示唆してい

る。



現在得られた人工酵素は、SNase に比べ 1000 分の 1 程度の活性しか示さない。現在の分子設計では、構造エレメントと機能エレメントを同時に考慮した分子設計にはなっておらず、今後、構造の最適化を考慮した分子設計を試み、人工酵素での機能最適化を試みる必要がある。しかしながら、本研究は、従来その実現が困難であった、Building block を基本とした分子設計の実現可能性を示すものであり、蛋白質分子設計法に対して新たな境地を切り開く成果であるといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. D. Novitasari, H. Kamikubo, Y. Yamazaki, M. Yamaguchi, M. Kataoka "Excited-State Proton Transfer in Fluorescent Photoactive Yellow Protein Containing 7-Hydroxycoumarin" *Advanced Materials Research* 896, 85-88 (2014) (査読あり)
2. Y. Kita, H. Kamikubo, M. Kataoka, M. Tachikawa "Theoretical analysis of the geometrical isotope effect on the hydrogen bonds in photoactive yellow protein with multi-component density functional theory" *Chem. Phys.* 419, 50-53 (2013) (査読あり)
3. Schotte F, Cho HS, Kaila VR, Kamikubo H, Dashdorj N, Henry ER, Graber TJ, Henning R, Wulff M, Hummer G, Kataoka M, Anfinrud PA. "Watching a signaling protein function in real time via 100-ps time-resolved Laue crystallography." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 20;109(47):19256-61 (査読あり)
4. Pool TJ, Oktaviani NA, Kamikubo H, Kataoka M, Mulder FA. "(1)H, (13)C, and (15)N resonance assignment of photoactive yellow protein." *Biomol NMR Assign.* 2013 Apr;7(1):97-100(査

- 読あり)
5. Oktaviani NA, Pool TJ, Kamikubo H, Slager J, Scheek RM, Kataoka M, Mulder FA. "Comprehensive determination of protein tyrosine pKa values for photoactive yellow protein using indirect ¹³C NMR spectroscopy." Biophys J. 2012 Feb 8;102(3):579-86. (査読あり)
 6. Mizuno M, Kamikubo H, Kataoka M, Mizutani Y. "Changes in the hydrogen-bond network around the chromophore of photoactive yellow protein in the ground and excited states." J Phys Chem B. 2011 Jul 28;115(29):9306-10 (査読あり)

〔学会発表〕(計 67 件)

1. H. Kamikubo
"Functional modification of a protein by using element implantaion" Sixth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations, 2013年11月25-27日, Okazaki, Japan
2. M. Kataoka
"The mechanism of induced folding of Staphylococcal nuclease" Telluride Conference on Protein Dynamics 2013, 2013年8月5-9日, Telluride, USA
3. M. Kataoka
"Is tertiary structure required for a specific function?" 8th Asian Biophysics Association Symposium, 2013年5月26-29日, Jeju, Korea
- 4.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kataoka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上久保 裕生 (KAMIKUBO HIRONARI)
奈良先端科学技術大学院大学・
物質創成科学研究科・准教授
研究者番号: 20311128

(2) 研究分担者

片岡 幹雄 (KATAOKA MIKIO)
奈良先端科学技術大学院大学・
物質創成科学研究科・教授
研究者番号: 30150254
山崎 洋一 (YAMAZAKI YOICHI)
奈良先端科学技術大学院大学・
物質創成科学研究科・助教
研究者番号: 40332770