

原子・分子の自在配列・配向技術と分子システム機能
2020年度採択研究代表者

2022年度
年次報告書

廣田 俊

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科
教授

3Dドメインスワッピングを利用したタンパク質の自在配列と機能化

主たる共同研究者:

重田 育照 (筑波大学 計算科学研究センター 教授)

一二三 恵美 (大分大学 研究マネジメント機構 教授)

研究成果の概要

本研究では、3Dドメインスワッピング(3D-DS)を参考に、タンパク質 2 量体の新しいコンピュータデザイン手法を開発した。設計の基となるタンパク質には好熱性水素細菌(HT) *cyt c*₅₅₂ を用いた。HT *cyt c*₅₅₂ のヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフのループ領域にヘリカルリンカーを挿入することで 2 量体 dCytCLL をモデリングした。深層学習プログラムを用いて主鎖構造から配列プロファイルを予測し、タンパク質デザインソフトウェア Rosetta を用いて主鎖構造を安定化するアミノ酸配列を設計した。得られたアミノ酸配列に対して AlphaFold2 を用いて立体構造を予測し、予測の確信度が高く、かつ、アミノ酸配列設計時の Rosetta エネルギースコアが低いアミノ酸配列を抽出し、組換え大腸菌を用いてタンパク質を発現した。安定な 5 種類の dCytCLL を精製し、それらの CD スペクトルを測定したところ、HT *cyt c*₅₅₂ と比較して 208 nm および 222 nm の負の値が大きく、設計したリンカーに由来する α ヘリックス含有量の増加が示唆された。5 つの dCytCLL のうち dCytCLL_E0184 の X 線結晶構造解析を行ったところ、立体構造を 1.33 Å の分解能で得た。得られた立体構造は、水素結合を形成する側鎖構造を含め、デザインした配列から予測された立体構造モデルと非常によく一致した。本手法は、様々なタンパク質に適用でき、機能的タンパク質を自在に組み合わせた新規多量体の創製への応用が期待される。また、ウマシクロム *c* (*cyt c*) は 3D-DS すると Met80 がヘム鉄から解離する。Met80 を Ala に変異させた M80A *cyt c* の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、*cyt c* のヘム鉄への強い His 配位と酸素化型での強い Fe-O 結合および O-O 結合の特性が明らかとなり、*cyt c* のペルオキシダーゼ活性に関連していることが示唆された。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Resonance Raman Studies on Heme Ligand Stretching Modes of Methionine80-Depleted Cytochrome *c*: Fe–His, Fe–O₂, and O–O Stretching Modes”, *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 127, No. 11, pp.2442-2449, 2023.