



日本学術振興会・产学協力委員会

R022 **量子構造生物学委員会**

第14回 研究会 資料

2024年6月6日 (木)  
13:30～17:00

ミーティングスペースAP日本橋 (東京)

## R022 量子構造生物学委員会 第14回研究会 プログラム

2024年6月6日（木）

会場：ミーティングスペース AP 日本橋  
〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-6-2  
日本橋フロント 6F

13:30 – 13:35

はじめに

委員長・三木邦夫（京都大学）

講 演

13:35 – 14:35 （講演1）

司会：委員・水口賢司（大阪大学）

ゼロからのタンパク質人工設計と折りたたみ可能なトポロジーの数

大阪大学・蛋白質研究所  
自然科学研究機構・生命創成探究センター  
古賀信康

14:35 – 15:00 休憩

15:00 – 16:00 （講演2）

司会：委員・山本雅貴（理化学研究所）

X線自由電子レーザーによるタンパク質非平衡状態解析

東北大学・多元物質科学研究所  
理化学研究所・放射光科学研究所センター  
南後恵理子

16:00 – 17:00 （研究交流討論）

委員・講師間の自由討論

ゼロからのタンパク質人工設計と折りたたみ可能なトポロジーの数

De novo design of protein structures and the number of possible topologies

大阪大学 蛋白質研究所 附属蛋白質先端データ科学研究中心 (ASPiRE)

自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)

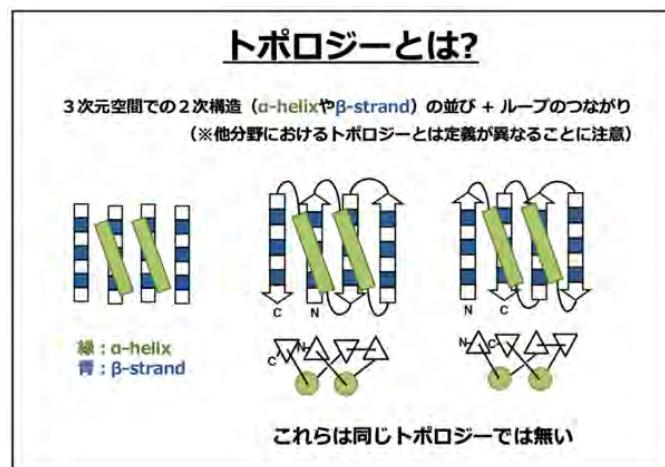
古賀信康

Nobuyasu Koga

ASPiRE, Institute for Protein Research, Osaka University

ExCELLS, National Institutes for National Sciences

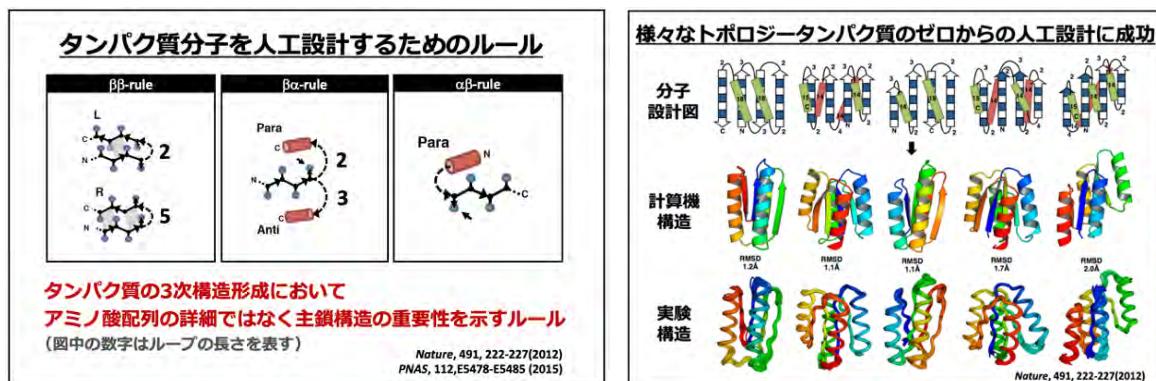
生命現象を司るタンパク質分子はアミノ酸配列に従い特定の立体構造を形成し機能を発現する。タンパク質分子のアミノ酸配列空間は広大であり、100残基のタンパク質でも約 $10^{130}$ 通りもの組み合わせが存在する。地球上の生物が1,000万種存在したとして、それぞれが10万個の固有の遺伝子を持っているとしたときのアミノ酸配列の総数は約 $10^{12}$ 通りであり、 $10^{130}$ に比べて非常に小さい。すなわち、自然によって探索されていないタンパク質が圧倒的な数存在していると考えられる。一方、毎年多くのタンパク質構造が実験的に決定されているが、タンパク質トポロジー ( $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ ストランドの2次構造の並びと、その連結の仕方) (右下図) という観点から、新規トポロジーが発見されることは近年難しくなっている。タンパク質が折り畳み可能なトポロジーは、自然によってほぼ全て探索され尽くされたのか、それとも自然が探索していない折り畳み可能な新規トポロジーはまだ多数存在しているのか、従来の研究では理論的な考察が行われてきたが、実験的な検証はなされていなかった。



上記の問い合わせに答えるためには、理論的な考察だけでなく、実際に新規トポロジーを持つタンパク質分子を主鎖を含めてゼロから人工設計することで研究することが重要である。しかしながら、従来の研究では、タンパク質を主鎖構造から設計するための技術が無く、新規タンパク質を設計する場合、その多くは、自然界のタンパク質の主鎖構造はそのままに側鎖構造のみを改変することで行われてきた。そこで、タンパク質分子を主鎖構造を含めてゼロから設計するための技術を開発し、新規トポロジーがどの程度存在するか明らかにすることを目指した。

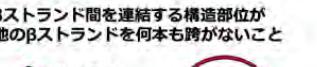
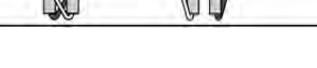
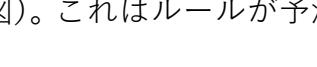
## 1. タンパク質分子を主鎖構造を含めてゼロから設計する技術の開発

タンパク質分子の折り畳み分子シミュレーションと自然界のタンパク質構造データベースを網羅的に解析することで、タンパク質が折り畳む立体構造は、アミノ酸配列の詳細よりも2次構造パターンやループの長さといった局所主鎖構造が重要であることを発見し、これらをルールとして体系化した [1,3,5,6] (左下図)。次に、これらのルールを用いることで分子設計図を描き、これらをもとに自然で観測される様々なトポロジーに折り畳むタンパク質を計算機でゼロから人工設計し、続いてこれらを実験で調べたところ、計算機で設計した通りの構造を形成していた (右下図)。また興味深いことに、設計したタンパク質の殆どが100°C以上の変性温度を示す、超安定な構造を形成していた [4]。

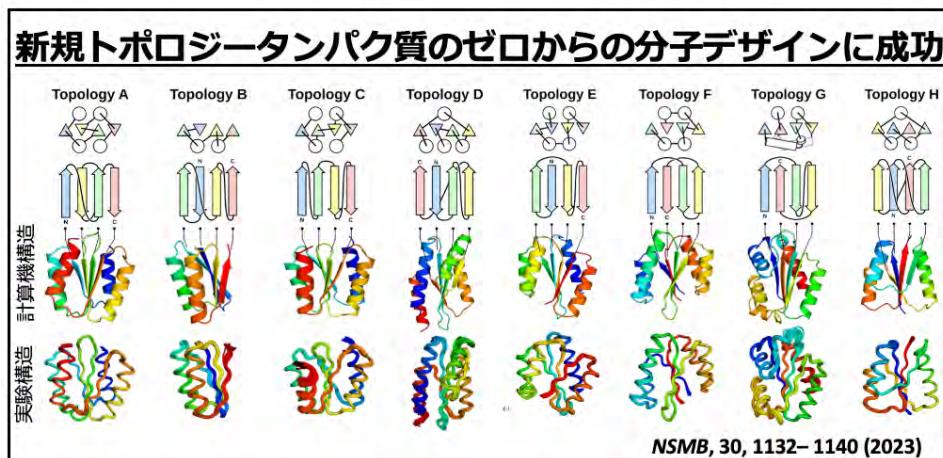


2. 自然界で観測されない新規トポロジーのタンパク質分子をゼロから人工設計  
することで、未踏の新規トポロジーが多数存在することを理論および実験的  
に解明

タンパク質が折り畳み可能なトポロジーを理論的に予測するルールを構築（左下図）し、4-8本の $\beta$ ストランドを持つ自然界に観測されない新規 $\alpha\beta$ 型トポロジー（約1万個）を予測した（右下図）。次に、1.で開発したタンパク質分子設計技術を用いて、ルールが予測する新規トポロジーのうち、4本の $\beta$ ストランドからなる新規トポロジー8個全てについて、これらのトポロジーのタンパク質の人工設計を試みた。

<p><b>折り畳み可能な<math>\alpha\beta</math>型トポロジーを見分けるルール</b></p> <p>(i) <math>\beta</math>ストランド間を連結する部位が交差しないこと</p>    <p>(ii) <math>\beta</math>ストランド間を連結する構造部位が他の<math>\beta</math>ストランドを何本も跨がないこと</p>   <p>(iii) 摩り合う<math>\beta</math>ストランドに連結されるループが異なる<math>\beta</math>シート面に存在しないこと</p>  	<p><b>ルールで予測した新規トポロジー数</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>ストランド本数</th> <th>トポロジー数</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>111</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>663</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>2,571</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>9,003</td> </tr> <tr> <td><b>合計</b></td> <td><b>12,356</b></td> </tr> </tbody> </table>	ストランド本数	トポロジー数	4	8	5	111	6	663	7	2,571	8	9,003	<b>合計</b>	<b>12,356</b>
ストランド本数	トポロジー数														
4	8														
5	111														
6	663														
7	2,571														
8	9,003														
<b>合計</b>	<b>12,356</b>														

その結果、これら全てのトポロジーを持つタンパク質分子の創出に成功した[2]（下図）。これはルールが予測する他の5-8本 $\beta$ ストランドの新規トポロジー



も同様に折り畳み可能であることを示唆し、少なくとも約1万個もの新規トポロジーが自然に探索されず存在することを意味する（これに対して、現在自然界で発見されている新規 $\alpha\beta$ 型タンパク質のトポロジー数は400個である）。この結果は、地球上の生命は偶然発見したタンパク質トポロジーを繰り返し利用していることを示唆すること、また新規トポロジーを持つタンパク質分子を設計することで、医療や産業に貢献する新規タンパク質の創出につながることが期待される。

- 
1. #K. Sakuma, #N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Nagashima, T. Fujiwara, K. Suzuki, N. Kobayashi, T. Murata, T. Kosugi, R. Tatsumi-Koga, \*N. Koga, Design of complicated all- $\alpha$  protein structures, *Nature Structural & Molecular Biology*, **31**, 275-282 (2024).
  2. #S. Minami, #N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Nagashima, T. Fujiwara, R. Tatsumi-Koga, G. Chikenji, \*N. Koga, Exploration of novel  $\alpha\beta$ -protein folds through de novo design, *Nature Structural & Molecular Biology*, **30**, 1132-1140 (2023).
  3. \*#N. Koga, #R. Koga, #G. Liu, J. Castellanos, G. \*T. Montelione, \*D. Baker, Role of backbone strain in de novo design of complex  $\alpha/\beta$  protein structures, *Nature Communications*, **12**:3921 (12 pages) (2021).
  4. \*R. Koga, #M. Yamamoto, #T. Kosugi, #N. Kobayashi, T. Sugiki, T. Fujiwara, \*N. Koga, Robust folding of a de novo designed ideal protein even with most of the core mutated to valine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**(49), 31149-31156 (2020).
  5. #Y. Lin, #\*N. Koga, R. Koga, G. Liu, A. F. Clouser, G. T. Montelione, \*D. Baker, Control over overall shape and size in de novo designed proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**(40), E5478-5485 (2015).
  6. #N. Koga, #R. Koga, #G. Liu, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione, \*D. Baker, Principles for designing ideal protein structures, *Nature*, **491**(7423), 222-227 (2012).

# X線自由電子レーザーによるタンパク質非平衡状態解析

Non-equilibrium state analysis of proteins by X-ray free electron laser

東北大学 多元物質科学研究所 国際放射光イノベーション・スマート研究センター  
理化学研究所 放射光科学研究中心

南 後 恵 理 子

Eriko Nango

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials,

Tohoku University

RIKEN SPring-8 Center

## 1. はじめに

生物の主要な構成物質であるタンパク質とその立体構造は深く関連しており、1950年代後半からタンパク質の立体構造解析が取り組まれてきた。タンパク質の立体構造解析手法としては、X線結晶構造解析、NMRが用いられてきたが、近年クライオ電子顕微鏡の発展が目覚ましく、いずれも原子分解能での構造解析が可能である。NMRは通常室温下で測定され、平衡状態の構造情報が得られる。一方で、X線結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡は、基本的には極低温下で測定されていることから、得られる構造は“静止した”状態である。しかし、タンパク質はその機能を発揮する際に、構造を巧みに変えることが知られており、静止した状態の観察だけでなく、機能に直結する“動いている”状態を原子レベルで解明することが期待してきた。

今世紀に入りX線自由電子レーザー (XFEL)が利用可能となった。XFELは高輝度、高空間コヒーレンス、極短パルスであることから、物質が高速で構造を変化させる様子や化学反応の可視化が可能である。また、XFELによる回折データは、“壊れる前に見る (diffraction before destruction)”ことが可能であり[1]、従来のX線結晶構造解析で課題となっていた放射線損傷の問題を克服することが期待された。XFEL施設としては、2010年にアメリカでLCLS (Linac Coherent Light Source)が、2012年に日本でSACLA (SPring-8 Angstrom

Compact free electron LAser)が供用を開始した。その後、韓国、スイス、ドイツと相次いでXFEL施設が供用を開始している。

我々は、XFELを用いたタンパク質動的構造解析法の開発に取り組み、タンパク質が起こす機能のメカニズム解明やそこから得られる情報を基にした分子設計応用を目指してきた。ここでは、その実験手法と実際の成果の概要について紹介する。

## 2. 時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析

時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析は、数10フェムト秒台以降の超高速ダイナミクスから数10ミリ秒程度までの構造変化を原子レベルで可視化する方法で、平衡に達する前の非平衡状態の観察を可能とする。従来のX線結晶構造解析では、単結晶を用いて放射線損傷を防ぐために極低温下で測定されるのが常法であったが、シリアルフェムト秒結晶構造解析 (Serial femtosecond crystallography, SFX) は、X線自由電子レーザーを用いて、室温下で多数の微結晶を連続的にXFEL照射位置まで輸送して回折像を得ている（図1）[2]。

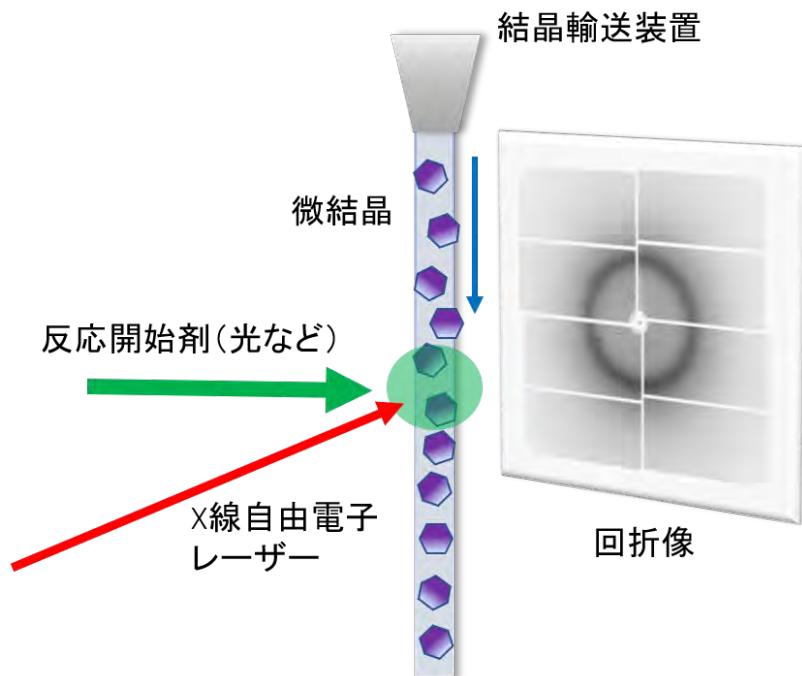


図1 シリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX)

SFX実験の概要。反応開始剤（図中の緑矢印）を組み合わせると時分割実験となる。ここでは、光励起を想定している。

XFELの照射後には結晶が壊れること、またXFELの繰り返し周波数が高いために連続的な結晶供給が必要である。具体的には、微結晶を緩衝液などの輸送媒体に懸濁させ、インジェクター（結晶導入装置）から流す方式であり、今までに様々なインジェクターが開発されてきた。個々の微結晶は異なる方向を向いており、様々な方位からの回折像を得ることができる。また、それぞれの回折像は結晶の方位だけでなく、結晶サイズも少しずつ異なることから回折強度にばらつきが生じる。同時に、XFELについてもビーム強度、スペクトルが異なるのでその影響も生じる。そのため各回折強度の平均化が必要で、従来の単結晶振動構造に比べ、より多くの回折像を必要とする。そのため、結晶の対称性によっても異なるが、1データセットあたり概ね1万枚程度の回折像を収集している。解析方法や、試料調製法などについては、別な総説に詳しく解説しているので、そちらを参考にして頂きたい [3]。

上記の方法を時分割実験とするには、反応開始するためのトリガーを組み合わせる必要がある。これまでに最も使われてきた方法は光励起である。光は素早く結晶内の分子を一斉に反応させることができ、超高速ダイナミクスの観察が可能である。結晶構造解析では、結晶内に含まれる分子の平均構造が電子密度図に反映されるため、分子の同期は非常に重要である。実際の解析では光照射前後の電子密度図を描くことにより、存在割合として20%程度の僅かな変化を知ることが可能で、その差からどのような構造変化が起こっているか解釈を行っている。SACLAで最初に開発された時分割SFX実験装置はこのポンププローブ型装置であり、実際に光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンを用いて実験が行われた。この実験では、光励起後16 nsから1.7 msにおいて、13のタイムポイントでの中間体構造を得ており、これらのスナップショットをつないでいくと、バクテリオロドプシンが光照射によってプロトンを輸送する様子を動画として捉えることができた（図2）[4]。

光励起による時分割SFX実験は、多くの光感受性試料で行われてきた。例として、光化学系II [5]、チャネルロドプシン [6]、クロライドポンプロドプシン [7]、DNA回復酵素 [8]が挙げられ、機能する際の動的構造やその機構が明らかになっている。最近では、光感受性のタンパク質だけでなく、低分子化合物の反応可視化への応用も行われている。この研究では、Mn(CO)3錯体の光解離過程を観察し、COが解離する過程の観察に成功している [9]。ユニークな点は、

金属錯体の結晶を用いるのではなく、金属錯体を特異的に結合させたリゾチーム結晶を利用しているところである。一般的に低分子化合物の結晶は分子が密にパッキングされており、反応による構造変化が制限される恐れがある。ここでは、リゾチーム内に金属錯体を位置特異的に固定し、比較的周囲の影響を受けにくい状況でCOの光解離を起こしており、タンパク質結晶の反応場としての利用が今後期待される。

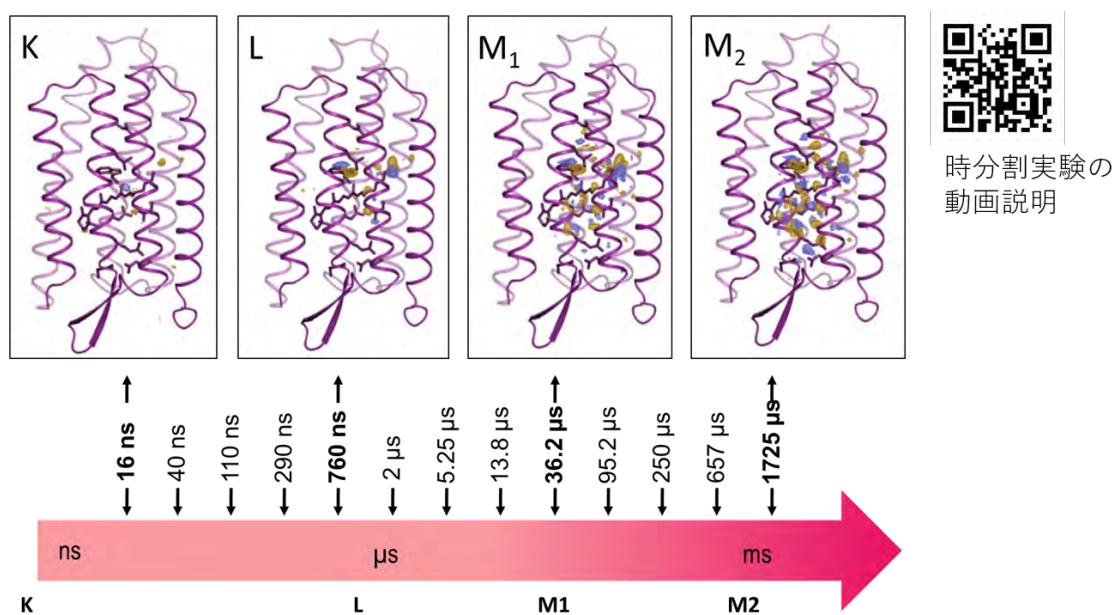


図2 バクテリオロドプシン時分割SFX研究で得られた結果概要

16 nsから1.7 msの間の13点で構造を取得したところ、主に4つの中間体が得られた。右のQRコードを読み込むと、時分割SFX実験についての動画公開サイトにつながる。

### 3. 光以外の反応誘起法開発

光による反応開始は時分割実験の主要な方法であるが、残念ながら光感受性タンパク質の全タンパク質に対する割合は1%にも満たず、本法は汎用的な方法とは言い難い。多くのタンパク質は基質やリガンドなど低分子化合物との結合を起点として開始することが多い。現在までに確立されている方法は3つあり、その1つはmix and inject SFXと呼ばれる二液混合方式である。2017年に最初に報告された方法では、二つの流路から結晶を含む溶液とリガンド溶液を別々に送液し、T字型ミキサーにより混合して時間を変えてXFELを照射するというLiquid jetを用いた実験であった[10]。この方式では混合に秒程度の時間を要し

ていたが、その後、二重のキャピラリー構造により二つの溶液を同軸流として流して、拡散により混合する方式も開発され、10 ms程度の時間分解能が可能となった。我々も同様のLiquid jetインジェクターを製作し、酵素反応過程を捉えることに成功している。ただし、この方法の場合は試料流速が数100  $\mu\text{l}/\text{min}$  と試料消費量が多いのが難点である。そのため、試料消費量削減を目的として、ベルトコンベアー方式を利用した二つの液滴混合による方式の検討も行っている。ピエゾ型液滴インジェクターを二台用意し、結晶を含む液滴の吐出後に基質を含む液滴を重ね合わせて拡散により基質を混合する。必要試料量は数10分の1に減少させることができたが、拡散効率が低く混合には概ね秒以上かかることが多い。そこで、基質溶液を複数回に分けて打ち込むことにより乱流を起こす方式など拡散効率を上げる方法が検討されている。

2番目の方法は、光解離性保護基で不活性化された化合物の利用である [11]。基質やリガンドに応じた合成が必要となるが、この場合は既に確立されたポンププローブ型実験装置を利用できる利点がある。ただし、光による解離が低収率だったり、解離が終了するのに時間を要したりするなどの問題があることもわかつてきたことから、どんな光解離性ケージを使用するか、そのデザインなど検討が必要であり、今後の検討が必要である。同じく光を利用する3番目の方法は、近赤外線を用いた温度ジャンプ法である。温度、電場などの物理的刺激はタンパク質への摂動となることから、ダイナミクス解明のために用いられてきた。実際、我々は近赤外線ナノ秒レーザーを用いてリゾチーム結晶に照射し、温度上昇による構造変化を20  $\mu\text{s}$ -200  $\mu\text{s}$ に渡って観察することに成功している [12]。温度上昇により、ドメイン間のヒンジ部分が揺らぎやすいことなどを見出し、本成果は温度を摂動とした初の時分割SFX実験例となった。更に、低温で酵素反応などの反応を止めておき、急激に温度上昇させることで、一斉に反応開始させる実験系も期待され、温度制御可能なインジェクターの開発などを進めている。

#### 4. おわりに

タンパク質が機能を発揮する際に起こる構造変化やそこで起こる反応を原子分解能で且つ高い時間分解能で観察する方法は、現在のところXFELを用いた時分割SFX法が唯一である。最近では、タンパク質と基質等を迅速に混合後凍

結させて、クライオ電子顕微鏡による構造変化を観察する方法も用いられつつあるが、不安定な中間体はクライオトラップでは観察されないこともあり、特に化学反応を可視化するのに本法は優れていると言える。本講演では、上記の実験手法や実際の構造解析をご紹介し、結晶構造解析やその他の放射光X線を用いた解析がどのように生体試料の解析に貢献できるか言及したい。

- 
1. Neutze R, Wouts R, van der Spoel D *et al.* *Nature* **406**: 752-757 (2000).
  2. Chapman H, Fromme P, Barty A *et al.* *Nature* **470**, 73-77 (2011).
  3. 南後恵理子, 中根崇智, 岩田 想 *日本結晶学会誌* **59**: 12-17 (2017).
  4. Nango E, Royant A, Kubo M *et al.* *Science* **354**:1552-1557 (2016).
  5. Li H, Nakajima Y, Nango E *et al.* *Nature* **626**: 670–677 (2024).
  6. Oda K, Nomura T, Nakane T *et al.* *eLife* **10**: e62389 (2021).
  7. Hosaka T, Nomura T, Kubo M *et al.* *PNAS* **119**: e2117433119 (2022).
  8. Maestre-Reyna M, Wang PH, Nango E *et al.* *Science* **382**: eadd7795 (2023).
  9. Maity B, Shoji M, Luo F *et al.* *ChemRxiv* doi:10.26434/chemrxiv-2023-f5xxd (2023).
  10. Stagno J, Liu Y, Bhandari Y *et al.* *Nature* **541**: 242–246 (2017).
  11. Toshia T, Nomura T, Nishida T *et al.* *Nat Commun* **8**: 1585 (2017).
  12. Wolff AM, Nango E, Young ID *et al.* *Nat Chem* **15**: 1549–1558 (2023).