

研究終了報告書

「タンパク質複合体を合理的に改造し、細胞内機能を理解・制御する」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 小杉貴洋

1. 研究のねらい

本研究の目的は、独自のタンパク質複合体制御技術を用いて、タンパク質複合体の機能を理解し、細胞機能を合理的に制御する技術を開発することである。

近年、計算機を用いたタンパク質設計技術が急速に発展し、様々な形・機能を持ったタンパク質を合理的に設計することが可能になってきた。それらの技術は天然のタンパク質の再設計にも用いられており、天然タンパク質の構造を鋳型として、新しい酵素や複合体の設計が行われている。しかしながら、それぞれのサブユニットが協奏的に働くことで機能を発揮するタンパク質複合体の制御は、その機能の複雑さからこれまでに成功していなかった。そういった中で、私はこのタンパク質複合体の協奏的な機能をアロステリックに制御する技術を開発し、回転型分子モーターの一つである V_1 -ATPase(V_1)の回転を加速、かつ制御することに成功した。

その手法は、タンパク質設計技術を用いて、タンパク質複合体の中にある進化の過程で機能を失った擬似酵素に、失われた機能を復活させることでアロステリーを起こすというものである。本研究では、まずこの方法により改造された腸球菌 V_1 を詳細に調べることで、その手法によって実現されたアロステリーの理解を深めると共に、擬似活性部位が機能を失った理由を明らかにすることを目指す。また、それらの研究を通して、この手法をさらに汎用的なものにするための手がかりを得つつ、腸球菌 V_1 以外のいくつかのタンパク質複合体を制御するための研究も行っていく。

さらに、この技術を用いて改造されたタンパク質複合体の機能と細胞機能の関係を明らかにし、細胞内での複合体機能を合理的に理解・制御するための方法の基盤を構築する。

2. 研究成果

(1) 概要

これまでに、独自のタンパク質複合体設計技術を用いて、腸球菌 V_1 -ATPase(V_1)に対して、アロステリック部位を設計し、その回転を加速・制御することに成功した。

まず、本研究では、これまでに改造した腸球菌 V_1 をより詳しく調べることで、基盤となる成果を論文として出版した(小杉ら *Nat. Chem.* 2023)。さらに、改造した腸球菌 V_1 の性質を調べていく中で、腸球菌 V_1 の中の擬似酵素がなぜその機能を失ったのか一つの仮説を得るに至った。

腸球菌 V_1 以外のタンパク質複合体の改造も行った。具体的には、酵母 V_1 を改造し、その回転能を制御する研究を行った。また、Target of Rapamycin (TOR)複合体の改造も行った。その結果、これまで同じであると考えられていた酵母の 2 種類の複合体が異なる役割をしていることを見出した(小杉ら *J. Cell. Sci.* 2024)。これらの研究により、改造タンパク質を用いて細胞内機能を理解・制御する基盤を作ることができた。

また、領域内の研究者とも積極的に交流を行い、さまざまな共同研究も進めてきた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「改造した腸球菌 V₁-ATPase の理解と手法の改良」

これまでに改造した腸球菌 V₁ に関して、その性質や加速機構メカニズムをより詳細に調べた。すでに結晶構造解析により、設計した部位に核酸が結合することを明らかにしていたが、ここでは溶液中における結合活性の測定を試みた。

Surface Plasmon Resonance (SPR), Isothermal Titration Calorimeter (ITC), Bio-Layer Interferometry (BLI) などさまざまな手法による活性測定を試みたが、結合活性を測定することはできなかった。そこで、Circular Dichroism (CD) 測定を用いた変性温度の測定をさまざまな基質濃度により行うことで、変性温度の変化から、

およそその結合活性を見積もることに成功した(図 1)。また、一分子実験により、回転が加速することは明らかになっていたが、溶液中においても特定の ATP 濃度で ATP 加水分解活性が上昇することを明らかにした(図 2)。これまでの成果に、これらの結果を加えることで、腸球菌 V₁ の改造に関して論文(小杉ら *Nat. Chem.* 2023)を出版することができた。

これらの結果は、失った機能を復活させると速度が加速することを示しているが、そうすると「なぜ進化の過程でその機能を失ったのか?」という疑問が生じる。そこで、天然 V₁ と改造 V₁ に対して、結晶構造や核酸に対する安定性の比較を行うことで、この疑問に答えられないか試みることにした。その結果、複合体構造を制御しやすくなるように進化した可能性が示唆された。

研究テーマ B 「その他のタンパク質複合体の改造」

我々の技術を発展させていくためには、腸球菌 V₁ 以外のタンパク質複合体を改造していくことが重要である。本研究では、まずこれまでとは異なる種の V₁ (出芽酵母 V₁) の改造をおこなった。酵母 V₁ も腸球菌 V₁ と同様に、擬似酵素を持つことが知られており、同じ方法で改造を行うことができるため、次のターゲットとして適していると考えられる。また、酵母において、改造した酵母 V₁ を酵母細胞内の V₁ と置き換えることは容易である。そして、酵母 V-ATPase の活性と細胞のアルカリ環境での生育は密接に関係していることが予想され、酵母 V₁ の速度を制御することが過酷な環境での細胞の生育を制御することにつながると考えられる。実

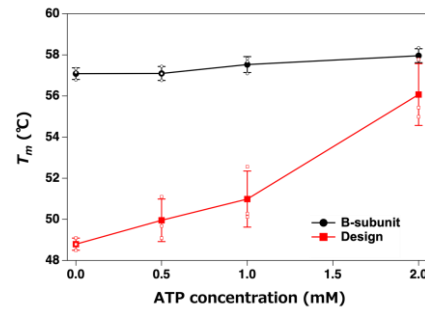


図 1. 変性温度の変化から基質結合を確認

天然 (B-subunit) は基質を加えても変性温度は変わらない (黒) が、デザインは基質を加えると変性温度が上がっていく (赤)。(T. Kosugi et al. *Nat. Chem.* 2023)

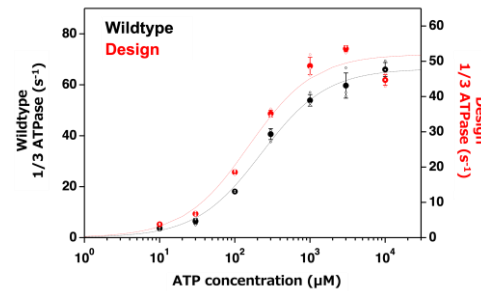
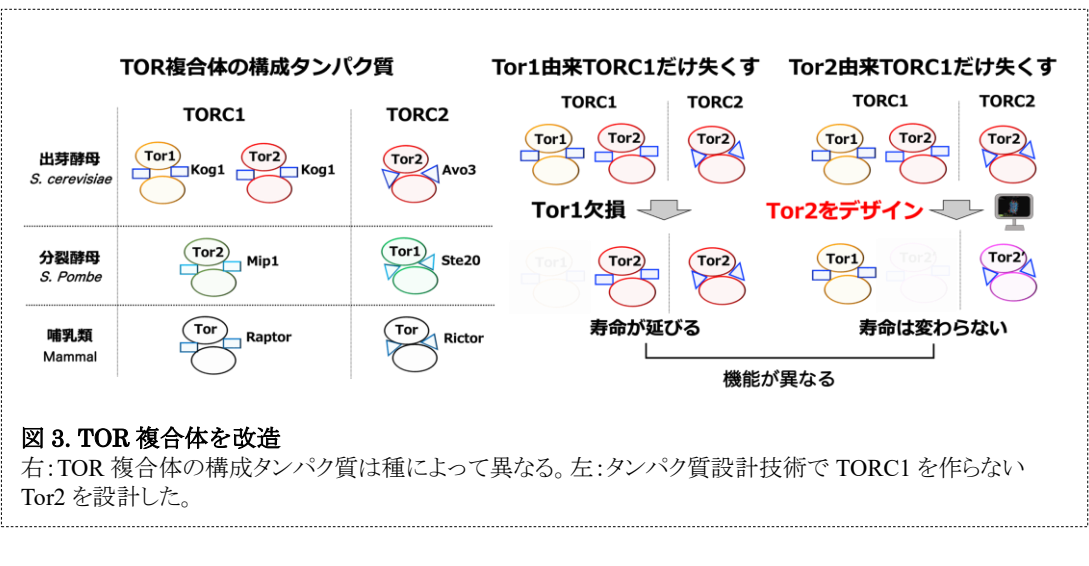


図 2. 溶液中での ATPase 活性

デザイン(赤)は加速が起きていることを確認(T. Kosugi et al. *Nat. Chem.* 2023)

際に、酵母 V₁ の活性が下がるいくつかの変異体を確かめると、その活性の強さと酵母の生育には相関があることを確認できた。そこで、酵母 V₁ の擬似酵素の失われた ATP 結合能を復活させた。

これまでと異なる複合体の構成タンパク質の組み合わせを変える改造も行った。細胞の環境への応答や細胞寿命に関わっている Target of Rapamycin (TOR) 複合体では、構成タンパク質を変えることで TORC1 と TORC2 という 2 種類の複合体を形成し、それぞれ異なる機能を持っていることが知られている。例えば、出芽酵母は Tor1 由来と Tor2 由来の 2 種類の TORC1 を持つが、分裂酵母や哺乳類では 1 種類だけである(図 3 左)。そして、出芽酵母の Tor1 由来 TORC1 だけをなくす(図 3 右、Tor1 由来 TORC1 だけ失くす)と細胞寿命が延びることが知られている。しかしながら、Tor2 由来 TORC1 だけを失くすことはできなかった(TORC1、TORC2 はともに細胞に不可欠で、Tor2 だけが TORC2 を作るので、Tor2 の欠損株は使えない)。そこで、タンパク質設計技術を用いて図 3 右のように Tor2 由来 TORC1 だけを作らない Tor2 変異体の作成に成功し、これまで全く同じ機能を持つと考えられてきた Tor1 由来 TORC1 と Tor2 由来 TORC1 が、異なる機能を持つことを明らかにした(小杉ら *J Cell Sci.*, 2024)。



3. 今後の展開

開発したタンパク質複合体制御技術に関して、これまでに改造した腸球菌 V₁-ATPase のメカニズムをさらに詳細に理解し、成果を論文として出版することができた。また、擬似酵素の役割の解明、手法の改良やその他のタンパク質への適用に関しても、ある程度成果を得ることができた。今後は、本研究の成果を基盤として、(1)タンパク質の種類、(2)構造変化の起こし方、(3)アロステリック部位の設計箇所をさまざまに変えていくことで、さらなる発展を目指していきたい。

さらに、擬似酵素に注目する手法以外にも、タンパク質複合体の構成タンパク質の組み合わせを変える新たな方法の開拓への手がかりを得ることもできた。この新たな方法に関しても、設計方法をより洗練させ、多様な対象に手法を適用することで、タンパク質複合体の制御技術を究めていきたい。

また、本研究により、タンパク質複合体制御技術から細胞制御技術へと発展させるための基盤もできた。これまでに細胞を扱う研究は行っていなかったが、酵母細胞内のタンパク質を、自分の手で改造したものへと入れ換えることができるようになり、さまざまな表現型の確認も可能になった。これにより、タンパク質設計技術により改造したタンパク質を実際に細胞内に導入することで、細胞の表現型を変えることもできるようになった。今後は、この技術を用いてタンパク質設計技術を用いた細胞生物学の研究も精力的に進めていきたい。さらに、さまざまな研究者と協力することで、酵母以外の多様な生物種にも適用範囲を広げていき、医療・農業・工業などの産業にも結びつけていきたい。

4. 自己評価

まずは、基盤となる研究を論文として出版できたことが、本さがけ研究における非常に重要な成果であったと考えている。次に、その成果をもとにして擬似酵素という視点で、分子モーターに新たな知見を与えることもできた。さらに新たなターゲットの改造にも成功し、新しい研究の方向性を見出すこともできた。記事の執筆や学会での講演などを行わせていただくことで、これらの研究成果の発信も積極的に行ってきた。今後は基盤となる技術の開発と新たな領域の開拓のバランスをとりながら、計算機によるタンパク質設計という基盤となる研究をしっかり進めながら、分子モーターをはじめ、さまざまな対象の改造を行い、細胞制御など新たな方向性の研究も積極的に進めていきたい。

領域内では、多数の研究者と出会うことができ、多くの刺激をもらった。タンパク質設計技術の視点から、多くの方々に意見も求められた。そして、いくつかは共同研究に発展している。研究期間のほとんどが新型コロナウイルス感染症の影響下にあったが、その中で領域内の研究者たちが交流できる場（サテライトミーティングやオンライン懇親会など）を企画させていただくなど、自分なりにできることに取り組んできた。領域会議においても、できる限りの交流の場を持てるよう、懇親会や研究会なども企画させていただいた。また、第 60 回日本生物物理学会年会での共催シンポジウム、第 23 回日本蛋白質科学会年会での共催ワークショップも企画させていただいた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Takahiro Kosugi, Tatsuya Iida, Mikio Tanabe, Ryota Iino, Nobuyasu Koga. Design of allosteric sites into rotary motor V_1 -ATPase by restoring lost function of pseudo-active sites. *Nat. Chem.* 2023, 15, 1591-1598.

タンパク質複合体に新しくアロステリック部位を設計し、その協奏的機能を制御する方法を考案し、回転型分子モーター V_1 -ATPase の協奏的機能である回転能を加速および制御することに成功した。この研究は、新たな手法を開発し、(1)天然タンパク質への新たな ATP 結合能を付与、(2)タンパク質複合体へのアロステリック部位の設計、(3)回転型分子モーターの加速、に初めて成功したものである。

2. Yoshiaki Kamada, Chiharu Umeda, Yukio Mukai, Hokuto Ohtsuka, Yoko Otsubo, Akira

Yamashita, Takahiro Kosugi. Structure-based engineering of Tor complexes reveals that two types of yeast TORC1 produce distinct phenotypes. *J Cell Sci.* 2024, 137, jcs261625.

構成タンパク質の組み合わせが異なる複数の複合体状態を持ち、細胞機能を制御している Target of Rapamycin (TOR) 複合体に対して、その複合体の組み合わせを変えることに成功した。その結果、これまで同じだと考えられていた酵母の二つの TOR 複合が細胞内で異なる役割を持っていることを明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

1. 2023 年度国立遺伝学研究所研究会「微生物の細胞複製システムから紐解く生命のデザイン」、タンパク質設計技術は単細胞生物研究に役立つのか?, 小杉貴洋, 2024 年 3 月 三島
2. 2023 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 構造解析が導くタンパク質の設計・改造とその理解, 小杉貴洋, 2024 年 3 月 水戸
3. OIST-JST JOINT MEETING, Allosteric control of rotary molecular motor by using protein design method, **Takahiro Kosugi**, 2024 年 1 月 沖縄
4. 定量生物学の会 第十一回年会, タンパク質設計技術による定量生物学を目指して, 小杉貴洋, 2024 年 1 月 東京
5. 16th Eurasia Conference on Chemical Sciences 2023, Control of functions exerted by protein complexes using protein design methods, **Takahiro Kosugi**, 2023 年 12 月 タイ・バンコク
6. The 2157th NIG Biological Symposium, Toward developing a new field of biology based on protein design, **Takahiro Kosugi**, 2023 年 11 月 三島
7. 第 61 回日本生物物理学会 シンポジウム「トア複合体による細胞応答の仕組みを理解する」, Toward understanding roles of yeast Tor complexes by structure-based engineering approach, **Takahiro Kosugi**, 2023 年 11 月 名古屋
8. 第 96 回日本生化学会大会 シンポジウム「情報計算科学にもとづく酵素の創成と応用 ~スーパー酵素が切り拓く生化学の新時代~」 計算機設計技術を用いたスーパー酵素の創出 小杉貴洋 2023 年 11 月 福岡
9. 第 12 回分子モーター討論会, タンパク質設計技術による細胞内回転型分子モーターの制御を目指して, 小杉貴洋, 2023 年 9 月 仙台
10. The East Asia Single-Molecule Biology Symposium 2023, Allosteric control of rotary motor V₁-ATPase by redesigning pseudo-active sites, **Takahiro Kosugi**, 2023 年 9 月 中国・温州
11. 第 23 回蛋白質科学会年会 シンポジウム「加速するタンパク質デザイン」, 蛋白質複合体が生み出す協奏的な機能の合理的な制御を目指して, 小杉貴洋, 2023 年 7 月 名古屋
12. 日本化学会第 103 春季年会 併催シンポジウム「発動分子科学」成果報告会~分子の発動が拓く次世代の化学~, 生体発動分子の改造とゼロからの設計, 小杉貴洋, 2023 年 3 月 野田
13. 研究会「化学反応のポテンシャル曲面とダイナミックス」, タンパク質設計技術を用いて生体内

化学反応を理解・制御する, 小杉貴洋, 2022 年 12 月 京都

14. 第 60 回日本生物物理学会 シンポジウム「高次構造体を自在に操る」, Toward rational control of concerted functions by supramolecular assemblies, **Takahiro Ksugi**, 2022 年 9 月 函館
15. Sendai2022 Workshop Allosteric control of rotary molecular motor by redesigning non-catalytic interface **Takahiro Kosugi**, 2022 年 8 月 仙台
16. 第 22 回蛋白質科学会年会 ワークショップ「AlphaFold の時代の分子シミュレーション」, 機能を持った“新しい”蛋白質の設計, 小杉貴洋, 2022 年 6 月 つくば
17. 第 22 回蛋白質科学会年会 シンポジウム「未来の話をしよう！」蛋白質(計算)科学から始まる生物学を目指して, 小杉貴洋, 2022 年 6 月 つくば
18. 日本化学会第 102 春季年会 中長期テーマシンポジウム「次世代分子システム化学のフロンティア—協奏的機能の創出と計測, タンパク質複合体の協奏的機能を合理的に制御することを目指して, 小杉貴洋, 2022 年 3 月 オンライン
19. 新学術領域「発動分子科学」×学術変革領域「分子サイバネティクス」共催ワークショップ, 回転型生体発動分子を合理的に改造して制御する, 小杉貴洋, 2022 年 3 月 オンライン
20. 第 59 回日本生物物理学会年会 第 8 回会員総会シンポジウム: 構造予測開闢, Rosetta から見た AlphaFold2, 小杉貴洋, 2021 年 11 月 オンライン

【受賞】

日本蛋白質科学会 2021 年度若手奨励賞優秀賞 受賞

【主要な著作物】

1. 失われた機能を復活させてアロステリック部位を設計する方法: 回転型分子モーター V₁-ATPase で実証, 小杉貴洋, 蛋白質科学会アーカイブ, 16, エッセイ 013, 2023 年
2. タンパク質設計技術で分子モーターを加速する, 小杉貴洋, 現代化学 2023 年 11 月号 No.632 東京化学同人, 24-27, 2023 年
3. タンパク質設計技術で目指す未来 – 特集 現代化学の最前線 2023, 小杉貴洋, 現代化学 2023 年 1 月号 No.622 東京化学同人, 34-36, 2022 年