

論文内容要旨 (和文)

2019年度入学 大学院博士後期課程3年

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 志賀 翔多

印

論文題目 β -Meander構造を起点とした β シートモデル蛋白質の再設計

本研究では、 β シートモデル蛋白質Outer surface protein A (OspA)の β -meander構造 (2本以上の逆平行 β ストランドがターン構造で連続的に連結された構造)を足場とした蛋白質再設計を報告する。蛋白質再設計とは、鋳型となる蛋白質の構造情報を足場にして蛋白質の構造を改変することで、望みの構造や機能を持つ蛋白質を創出する設計手法のことをいう。蛋白質再設計は、蛋白質の構造形成原理の理解に有効な設計手法といえる。なぜなら、蛋白質の再設計はしばしば鋳型蛋白質の物性に变化を与えるため、それらの評価を通じて蛋白質の構造形成原理に対する知見を得られるからである。今回我々は、OspAの再設計を通して、「ドメインスワッピング蛋白質のデザイン」と「伸長途中のアミロイド構造を模倣した蛋白質のデザイン」の2つの異なる方向性のデザインの確立を目指した。

本論文は序論、結果と考察、総括、実験方法、参考文献の全5章からなる。

序論では蛋白質デザインの背景、再設計のモデルとなる蛋白質OspA、本研究の目的と本論文の構成について説明する。

第2章の結果と考察は全4項からなる。

第1項「様々な単量体蛋白質のドメインスワッピングを可能にするデザインの確立」では、OspAの β -meander構造の境目に位置するループ構造の再設計による、汎用性が期待されるドメインスワッピング二量体のデザインについて報告する。再設計の結果、ループ構造へのポリプロリンロッドの挿入がドメインスワッピング二量体のデザインに有効であることが分かった。OspA以外の単量体蛋白質のループ構造へ本デザインを適用したところ、ドメインスワッピング二量体化したprotein Gの構造を得ることに成功し、本デザインが様々な蛋白質に汎用的に適用できる可能性が示唆された。

第2項「金属イオン応答型の分子スイッチのデザイン」では、第1項のドメインスワッピングデザインを足掛かりとした金属イオン応答型のドメインスワッピング二量体のデザインについて述べる。第1項で再設計の対象としたOspAのループ構造に、ポリ(His-Pro)を挿入した変異体が様々な金属イオンに応答して二量体を形成することを見出した。詳細な物性調査により二量体形成機構の探究も行なった。

第3項「溶液中でも安定なドメインスワッピング二量体のデザイン」では、溶液中では不安定なドメインスワッピング二量体の安定化を目指した、OspAの β -meander構造中のターン構造の再設計について報告する。先行研究で得られたドメインスワッピング二量体の結晶構造をもとに、ターン構造を β ストランドを好む配列に再設計し、分子間での β ストランドの会合を可能にすることで二量体の安定化を試みた。ターン構造をCys-Thr-Cysの3残基からなる変異体が溶液中でも二量体を形成していることが分かった。得られた二量体の結晶構造からドメインスワッ

ピング二量体を形成していることが確認できた。

第4項「伸長途中のアミロイド構造を模倣した蛋白質のデザイン」では、OspAのC末端のキャッピングドメインの欠失による、末端が露出した β -meander構造を持つ蛋白質のデザインについて述べる。キャッピングドメインを欠失させた蛋白質は、溶液中で単量体として存在していることが分かった。結晶構造解析から、キャッピングドメインを欠いた β シート構造が維持されていることが分かった。末端の β ストランドの一部は定型をとっていないことが示唆された。50 ns間の分子動力学シミュレーションから、末端が露出した β シートは構造を維持することが示唆された。これらのゆらぎの評価から伸長途中のアミロイド線維の構造的特徴について推察した。

以上全4項の研究結果を第3章にて総括し、第4章に実験方法、第5章に参考文献を記述し、博士論文とした。

論文内容要旨 (英文)

2019年度入学 大学院博士後期課程3年

バイオ工学専攻 バイオ化学分野

氏 名 志賀 翔多



論 文 題 目 Redesign of a β -sheet model protein

In this study, we report a protein redesign of the β -sheet model protein Outer surface protein A (OspA) based on the β -meander structure (a structure consisting of two or more inverted parallel β -strands continuously connected by a turn structure). Protein redesign is an effective design method for understanding the principle of protein structure formation because characterizations of redesigned proteins often give us insights into the principle of protein structure formation. Through the redesign of OspA, we aimed to establish two different designs: the design of a domain-swapped protein and the design of a protein that mimics the amyloid structure in the process of elongation.

This thesis consists of five chapters: introduction, results and discussion, conclusion, experimental methods, and references.

In Chapter 1, we present the background of the protein design and the model protein OspA, the purpose of this study, and the structure of this thesis.

In Chapter 2, we describe results and discussion of the study. This Chapter is organized as follows. In the 1st section, "Establishment of a design that enables domain swapping of various monomeric proteins," we report our attempts to establish the domain-swapping design that can induce domain-swapping dimerization of various monomeric proteins. We tried to establish the domain-swapping design by redesigning the loop structure located at the border of the β -meander structure of OspA. As a result, polyproline rod insertion into the loop structure was found to be effective in designing the domain-swapped dimer. By applying the design to the loop structure of a protein G, we have successfully obtained a domain-swapped dimer of protein G. The results suggest the possibility that the domain-swapping can be applied to a variety of monomeric proteins. In the 2nd section, "Design of a metal ion-responsive molecular switch," we describe the design of a metal ion-induced domain-swapped dimer, using the domain-swapping design in 1st section as a starting point. We found that poly (His-Pro) insertion into the loop structure of OspA, induce dimers in response to various metal ions. We explored the mechanism of dimer formation through detailed physical properties evaluation. In the 3rd section, "Design of a stable domain-swapped dimer in solution," we report on the redesign of the turn structure in the β -meander structure of OspA to stabilize the domain-swapped dimer, which is unstable in solution. Based on the information of crystal structure of the domain-swapped dimer obtained in our previous study, we redesigned the turn structure to a sequence that favors the β -strand, and attempted to stabilize the dimer by allowing the β -strands to form β -sheet between molecules. A mutant of the turn structure consisting of three residues, Cys-Thr-Cys, was found

to form a dimer even in solution. The crystal structures of the obtained dimers revealed the formation of the domain-swapped dimer. In the 4th section, " Design of a model protein that mimic amyloid structure in the process of elongation," we describe the design of a protein with an exposed β -sheet edge by deleting the C-terminal capping domain of OspA. The designed protein was found to exist as a monomer in solution. Crystal structure analysis shows that the β -sheet structure is maintained without the capping domain. Molecular dynamics simulations over 50 ns suggest that the β -sheet with exposed edge retains its structure. From the evaluation of these fluctuations, we inferred the structural characteristics of amyloid fibrils in the process of elongation.

In Chapter 3, we describe some conclusion and future work.

In Chapter 4, we present experimental methods.

In Chapter 5, we list references.

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和 4 年 2 月 7 日

理工学研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 真壁 幸樹 印
副査 今野 博行 印
副査 羽鳥 晋由 印
副査 印
副査 印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	専攻・分野名 バイオ工学専攻バイオ化学分野 氏名 志賀 翔多		
論文題目	β-Meander 構造を起点とした β シートモデル蛋白質の再設計		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和 4 年 1 月 21 日～ 令和 4 年 1 月 31 日
論文公聴会	令和 4 年 1 月 31 日	場 所	工学部 4 号館 214 教室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	令和 4 年 1 月 31 日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000 字程度)

天然の蛋白質がもつ分子構造を改変する蛋白質の再設計技術は人工蛋白質の工業応用や物性の基盤的理解において重要である。本論文では、蛋白質の β シート構造の一種である β-meander 構造に着目し、分子構造の再設計を報告している。

第 1 章では研究の背景や蛋白質の設計に関する研究の動向、本研究で用いたモデル蛋白質である OspA について述べられている。本研究の根幹となる蛋白質設計技術および研究の位置づけを明確に述べており、研究を遂行するために必要な十分な専門知識に基づいて記述されている。第 2 章では、ドメインスワッピング二量体の設計、それに基づく金属イオンによる構造スイッチ蛋白質の設計、溶液中で安定な β-meander 構造の設計について、得られた結果と考察を記述している。ドメインスワッピング二量体の設計では、これまでに前例のない数アミノ酸からなる剛直構造（ポリプロリンロッド）をドメインスワッピング構造の安定化に用いて、蛋白質の人工的なドメインスワッピングを成功させた研究について述べている。金属イオンによる構造スイッチでは、ドメインスワッピングの人工設計に基づいて金属結合部位を導入し、全く新しい金属イオン依存的な構造二量体化スイッチを実現させた研究成果について述べている。溶液中で安定な β-meander 構造の設計では、アミロイドなどに見られるペプチドの自己組織化した構造の伸長末端の構造状態を模倣した人工蛋白質を設計して詳細な分子構造の決定に成功したことを述べている。これらは他に前例がなく新規性と独自性が高い研究である。第 3 章では、第 2 章で示した結果を総括して本研究の結論が述べられている。第 4 章では、本研究を行うための実験方法が記載されている。実験方法は本研究を再現するために必要十分な情報が記述されている。本論文は研究内容を把握する上で適切に構成されており、体裁が整っている。第 2 章での各項目に対する考察と第 3 章の論文の総括では、β-meander 構造という蛋白質の構造モチーフを軸として蛋白質の再設計に関する指針が示されており、明確な結論が示されている。

本研究の成果は、2 報の英語学術論文に掲載されており、審査基準を満たしている。以上より、博士（工学）の学位論文として価値と水準を十分に満たしており、合格と判断した。

本論文は、研究倫理又は利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

最終試験の結果の要旨

本学の規定に従い、主査および副査 2 名の計 3 名が参加した学位論文に関する 40 分間の口頭発表を行い、その後の 30 分の口頭による質疑応答で最終試験を行った。まず、本研究の目的、本研究に関する考察までの内容について明確な説明があった。また、蛋白質の立体構造や物理化学に関する専門知識に関する質疑応答では的確で正確な回答であった。以上の口頭での最終試験から、博士（工学）として必要とされる専門知識および研究能力を十分に備えているものと判断し、最終試験を合格と判定した。