

## タンパク質分子機能の合理的設計

(東大院総合文化<sup>1</sup>・東大院理<sup>2</sup>) ○新井 宗仁<sup>1,2</sup>

Rational design of protein molecular functions (<sup>1</sup>*Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo*, <sup>2</sup>*Graduate School of Science, The University of Tokyo*)○Munehito Arai<sup>1,2</sup>

Protein molecules are essential for life phenomena and have diverse functions including binding and catalysis. Rational design of such protein functions has been a great challenge. In this talk, I will present our efforts of theoretical protein design to strengthen protein-protein interactions and to accelerate an enzyme reaction. I will also show an example of sophisticating protein function by rational connection and multimerization of proteins.

Many proteins exert their functions through protein-protein interaction (PPI) with other proteins *in vivo*. Since PPI is also involved in various diseases, designing proteins for PPI inhibition is directly related to drug discovery. We focused on the interactions of the KIX domain of the transcriptional coactivator CBP with various transcriptional activators. These PPIs are involved in leukemia, cancer, and viral infections. Using fragments of the KIX-binding transcriptional activators MLL and c-Myb as templates, we attempted to theoretically design peptides that bind KIX more tightly than the wild type. We were able to create such peptides by rational design using the Rosetta software and secondary structure prediction.

We are also working on the development of the methods to rationally improve enzymatic activity. We searched for the mutants that could accelerate the rate-limiting step in the catalytic cycle of dihydrofolate reductase (DHFR) by theoretical comprehensive mutation analysis. Many of the designed mutants showed high activity as predicted. Moreover, we succeeded in increasing the DHFR activity by 4-fold with a single amino-acid substitution.

In addition, we rationally designed a protein that changes its binding partner in a pH-dependent manner. Specifically, by connecting an antibody-binding protein, Protein A, with a protein that dimerizes at low pH, we created a chimera that binds to antibody at neutral pH and dissociates it by dimerization at low pH. This chimera is expected to be used for purification of antibodies. Rational design of such "mutually exclusive binding" will be useful in regulating protein functions.

**Keywords :** *Protein, Rational Design, Binding, Enzyme*

タンパク質は生命現象を駆動する物質であり、結合や触媒などの多様な機能を有する。このようなタンパク質機能の合理的設計は大きな挑戦である。本講演では、我々が取り組んでいるタンパク質の理論的設計、特に、タンパク質間結合の強化や、酵素反応の高速化の例を紹介する。また、タンパク質の連結や多量体形成を合理的に行い、タンパク質機能を高度化させる例も紹介する。

多くのタンパク質は、生体内で他のタンパク質との相互作用 (protein-protein interaction, PPI) を介して機能を発揮する。PPI は様々な疾患にも関与しているため、PPI 阻害タンパク質の設計は創薬と直結しうる。我々は転写コアクチベーターCBP の KIX ドメインと転写アクチベーターとの相互作用に着目した。KIX にはさまざまな転写アクチベーターが結合し、白血病やがん、ウイルス感染などに関与する。そこで、

KIX に結合する転写アクチベーターMLL や c-Myb の断片を鋳型とし、これらよりも強く KIX と結合するペプチドを理論的に設計することを試みた。タンパク質設計用ソフトウェア Rosetta や二次構造予測などを用いた合理的設計により、実際にそのようなペプチドを創出することができた。

我々はまた、酵素活性を合理的に向上させる方法の開発にも取り組んでいる。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の酵素反応サイクルには複数の反応ステップがあるが、その律速段階を加速しうる変異体を、理論的な網羅的変異解析によって探索した。設計された変異体を実際に作製して検証した結果、多くの変異体で予測通りの高活性化がみられた。また、1 アミノ酸置換のみで DHFR の活性を 4 倍向上させることに成功した。

さらに我々は、pH 依存的に結合相手を変えるタンパク質を合理的に設計した。具体的には、低 pH で二量体になるタンパク質と、抗体結合タンパク質 (Protein A) を連結させることで、中性 pH では抗体に結合し、低 pH では二量体化して抗体を解離するキメラを作製した。このキメラは抗体医薬品などの精製に使用可能と期待される。このような「互いに排他的な結合 (mutually exclusive binding)」の合理的設計は、タンパク質機能を制御するうえで有用であろう。