

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	機能超分子化学研究室 (廣田 俊 教授)		
学籍番号	2221018	提出	令和6年12月17日
氏名	中村 伊武輝		
題目	アデニル酸キナーゼの構造状態を認識する人工結合タンパク質の創成と複合体形成機構の解明		

**第1章：序論** タンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI)は連鎖的に進行する生体反応において重要な役割を担っており、PPI によって標的タンパク質機能を制御する戦略は、抗体医薬に見られるように、応用展開されている。さらに、近年、分子量サイズが小さく扱いやすい人工結合タンパク質の開発も脚光を浴びている。モノボディ (mb、図 1a)は、ヒト由来フィブロネクチン Type III ドメインを分子骨格とする人工結合タンパク質であり、分子側面にランダムに変異を導入したライブラリーを用いて、ファージディスプレイおよび酵母表面ディスプレイ技術を駆使することで、標的タンパク質に特異的に結合する mb を得ることができる。これまで、mb を用いて標的タンパク質の機能をアロステリックに制御する試みがなされているが、わずかな構造

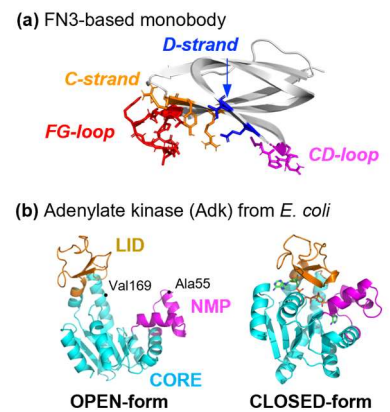


図 1. モノボディ (mb)と大腸菌由来アデニル酸キナーゼ (Adk)の構造

変化の認識・制御に留まっており、数十 Å 単位の大きな構造変化を示すタンパク質の機能制御にも適用できるかどうかは明らかでない。そこで、本研究では、mb の適用可能性を検証するために、ADP ⇌ ATP + AMP のリン酸転移反応を触媒し、基質の有無で OPEN⇌CLOSED の大きな構造変化を示す酵素である大腸菌由来アデニル酸キナーゼ (Adk, 図 1b) の変異体(A55C/C77S/V169C; Adk<sub>tm</sub>)をモデルに、それぞれの構造を選択的に認識する mb を創出し、酵素活性制御、複合体形成機構を検証した<sup>2,3)</sup>。

**第2章：アデニル酸キナーゼの構造状態を認識するモノボディの取得と酵素活性への影響** M13 ファージを用いたファージディスプレイによって、Adk<sub>tm</sub> の CLOSED 構造に結合する mb を 1 種類 (CL-1)、OPEN 構造に結合する mb を 3 種類 (OP-2, 3, 4) 取得した。mb の解離定数を酵母提示/フローサイトメトリーより評価したところ、それぞれの mb は nM オーダーの解離定数を有しており、OPEN/CLOSED 構造の識別結合能も確認できた。Cys55 および Cys169 にピレン誘導体を修飾した Adk<sub>tm</sub> を用いて、エピトープマッピングによって mb のおおよその結合位置を調べたところ、OP-2、3 は Adk の基質結合経路付近に、CL-1、OP-4 は基質結合経路より離れた位置に結合していることが示唆された。mb 存在下での Adk<sub>tm</sub> 酵素活性への影響について、ADP を基質としたときの AMP の生成量を HPLC 分析によって評価した。その結果、CL-1、OP-3 は影響を与えなかったが、OP-2、OP-4 では酵素活性を阻害する挙動を示し、特に、OP-4 はほぼ酵素活性が消失する程度に強く酵素活性を阻害した。

### 第3章: CLOSED 型 Adk を認識するモノボディ (CL-1)の機能と複合体形成機構

CL-1 の結合メカニズムを明らかにするために、まず、等温滴定カロリーメトリー (ITC)測定を行ったところ、CL-1 はエンタルピー駆動型の結合を示した。次に、単結晶X線構造解析を行ったところ、CL-1 が Adk の CORE ドメインの外側に結合し、多点の水素結合およびカチオン- $\pi$ 相互作用が存在する構 (図 2a)が得られ、CL-1 結合による Adk の主鎖構造はほとんど変化していないことが分かった (図 2b)。さらに、Adk に対する遷移状態アナログである Ap<sub>5</sub>A の結合挙動を、Adk にピレンを 2 分子修飾した修飾 Adk を用いて評価した。この系では、Ap<sub>5</sub>A 結合に伴う CLOSED 構造の形成によって、ピレンが Adk 表面で接近しエキシマー蛍光が観測される。CL-1 存在下の Ap<sub>5</sub>A の解離定数は  $K_d=0.035 \mu\text{M}$  であり、CL-1 非存在下での値 ( $K_d=0.15 \mu\text{M}$ ) よりも小さかった。したがって、CL-1 は CLOSED 構造状態の形成を促進し、安定化させていることが明らかになった。

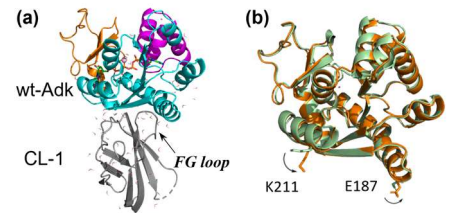


図 2. CL-1-野生型 Adk (wt-Adk)複合体の X 線結晶構造解析 (分解能 1.69 Å); (a) 全体構造; (b) CLOSED 型 wt-Adk と CL-1-wt-Adk 複合体の全体構造から抽出した wtAdk 部分の重ね合わせ構造 (緑: wt-Adk, 橙: CL-1 との複合体中の wt-Adk 部分)。

### 第4章: OPEN 型 Adk を認識するモノボディ (OP-4)の機能と複合体形成機構

OP-4 の結合を ITC 測定で評価したところ、CL-1 と異なり、OP-4 はエントロピー駆動型の結合を示し、OP-4 結合による脱水和の影響が大きいことが示唆された。次に、OP-4-Adk の複合体構造をゲルろ過クロマトグラフィー/X 線小角散乱測定 (SEC-SAXS)によって観測したところ、OP-4 が活性部位ではなく Adk の活性部位の外側のヒンジ部分を含む領域への結合し、Adk の OPEN 構造の特徴である V 字型構造は維持されていることが示唆された (図 3)。さらに、OP-4 結合による Adk の構造変化を CD スペクトル測定および <sup>15</sup>N ラベル化 Adk を用いた <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC によって観測した。その結果、CD スペクトルには変化が見られず、OP-4 結合による Adk の二次構造へ影響はないことが示されたが、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC においては OP-4 存在下で主鎖 N-H のピークシフトが Adk 全体に見られ、OP-4 結合により Adk 全体の主鎖構造が変化していることが示唆された。しかし V 字型構造が維持されていることから、基質 ATP が Adk 内部にコンタクトできるかどうかを <sup>31</sup>P-NMR スペクトルを用いて評価した。通常、Adk 存在下での ATP の <sup>31</sup>P-NMR シグナルは、ATP の Adk への結合に伴ってブロード化し、このブロード化は、OP-4 存在下でも観測された。また、CL-1 と同様に Ap<sub>5</sub>A の結合挙動を、ピレン修飾 Adk を用いて評価したところ、OP-4 存在下ではエキシマー蛍光が観測されなかった。このことから、OP-4 は、基質の Adk へのコンタクト機能を維持しながらも、Adk の OPEN 構造を安定化させていることが明らかになった。以上のことから、OP-4 は Adk の基質結合経路でなくヒンジ領域への結合によって、構造変化過程に摂動を与えて Adk 活性を阻害していると考えられる。

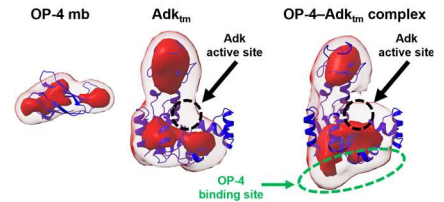


図 3. SEC-SAXS 測定結果を DENSS プログラムによって解析した OP-4, Adk<sub>m</sub> 単体および OP-4-Adk 複合体の溶液構造。

**第5章: 結論** 本研究では、溶液中で数十 Å の大きな構造変化を示すタンパク質の機能制御に mb が適用可能かどうかを検証するために、Adk をモデルタンパク質として、Adk の各構造状態を認識する mb の創成を達成した。それぞれの mb は Adk に結合することでその構造状態の安定化に寄与しており、特に、OPEN 構造を認識する mb は Adk の構造変化を抑制することで触媒活性を阻害しており、mb が、PPI により酵素活性をアロステリックに制御できるツールとして有用であることが示された。

1) Koide, A.; Koide, S. *et al. J. Mol. Biol.* 284, 1141–1151 (1998)

2) Nakamura, I.; Amesaka, H.; Kamikubo, H.; Tanaka, S.-I.; Matsuo, T. *et al. Protein Sci.* 32, e4813 (2023)

3) Nakamura, I.; Tanaka, S.-I.; Matsuo, T. *et al. to be submitted.*

## (論文審査結果の要旨)

タンパク質-タンパク質相互作用(PPIs)は、連鎖的に進行する生体反応を担う重要な要因であり、PPIs を標的として、抗体医薬や、抗体の機能を持ちながら分子サイズが小さい「抗体ミメティック分子」の開発が行われてきた。モノボディは抗体ミメティック分子の1つであり、疾病の原因となる生体高分子への適用が試みられているが、PPIs は構造が事前組織化されたタンパク質界面で有効に働くことから、構造柔軟性の高いタンパク質に対するモノボディの適用可能性は不明であった。本研究は、生物界に広く分布し、OPEN/CLOSED 構造状態を相互変換するリン酸基転移酵素「アデニル酸キナーゼ(Adk)」を用いて、各構造状態を認識して酵素活性に影響を及ぼすモノボディの取得可能性とその複合体形成機構を検証し、以下の事項を明らかにしている。

(1) フェージディスプレイ法により、Adk の CLOSED 型に結合するモノボディを1種類(CL-1) および OPEN 型に結合するモノボディを3種類(OP-2, 3 および 4) を取得し、OPEN/CLOSED 認識能も確認された。エピトープマッピングにより、CL-1 および OP-4 は Adk の基質結合サイトから離れたところに結合することが示された。さらに、モノボディ存在下でのキナーゼ活性評価によって、OP-4 が強い阻害作用を示すことが見出された。

(2) CL-1 の Adk への結合様式について、等温滴定カロリーメトリー(ITC)によってエンタルピー駆動型であることが見出された。また、X線結晶構造解析によって、Adk との複合体の全体構造が明らかにされた。さらに、ピレン修飾 Adk を用いた CL-1 存在下での Ap<sub>5</sub>A (遷移状態アナログ) の結合挙動の観測により、CL-1 が Adk の CLOSED 構造を安定化する機能をもつことが示された。

(3) キナーゼ活性阻害を示す OP-4 について、ITC 測定によってエントロピー駆動型で Adk に結合することが明らかとなり、複合体形成の主要因が脱水和であると帰属された。また、複合体の溶液構造について、ゲル濾過クロマトグラフィー/X線小角散乱および <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-NMR 測定によって、OP-4 が Adk のヒンジ領域付近に結合し、Adk 全体の主鎖構造に摂動を与えていることを見出した。<sup>31</sup>P-NMR 測定による ATP の結合挙動の観測およびピレン修飾 Adk に対する Ap<sub>5</sub>A 滴定の観測結果から、OP-4 は、基質結合を妨げずにキナーゼ活性に必須である「CLOSED 構造への構造転移」を止める機能をもつことが実証された。

以上のように、本論文では、モノボディが柔軟なタンパク質の機能制御ツールとして適用できることが示され、その複合体形成機構も明らかにされた。これらの内容は、生体分子化学分野の新たな知見を与えるとともに、モノボディが新たな創薬分子のプラットフォームとして利用できることを示しており、学術的に意義がある。よって、審査委員一同は本論文が博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。