

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05926

研究課題名(和文) 高安定かつ高結合性を持つ低温ショック蛋白質変異体の開発とPCR法への応用

研究課題名(英文) Design of highly stabilized cold shock protein having high binding ability and its application for PCR method

研究代表者

城所 俊一 (Kidokoro, Shun-ichi)

長岡技術科学大学・工学研究科・教授

研究者番号：80195320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高度好熱菌由来低温ショック蛋白質(CSP)に2本のジスルフィド結合を導入した変異CSPを設計、大腸菌で大量発現・精製した。この変異体は中性pHで100℃を超える熱変性温度を示し、高い核酸結合性を保持しながらPCR使用に十分な熱安定性を持つことを確認し、実際に、この変異体を適度な濃度で共存させることで、PCRの伸張反応に必要な時間を短縮できることがわかった。しかし、高濃度の共存ではアニーリングの際の二重螺旋構造形成を阻害することによるPCR産物の減少が観測された。詳細な解析により、PCRに利用するためには、CSPの持つ核酸結合能を温度によってオン・オフ制御することが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、立体構造に基づく合理的設計により、分子機能を保持したまま100℃を超える高い熱安定性を付与することに成功し、また蛋白質核酸相互作用の新しい熱力学的手法を提供しており、学術的な意義は大きい。また、PCR法は遺伝子を扱う最も基本的な技術の一つであり、最近のCOVID-19の感染判定に使用されるなど広く使用されているが、途中で生じる一本鎖核酸は、分子内・分子間で高次構造を形成しやすい性質を持ち、これがPCRの予期しない結果を生む主な原因と考えられる。本研究課題は、一本鎖核酸の高次構造形成を抑制することでこの問題の解決をめざし、この実現のための課題を明確にしており、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Based on the three-dimensional structure of a cold shock protein (CSP) derived from *Thermus thermophilus* HB8, we designed a mutant CSP having two disulfide bonds, and expressed and purified it using *Escherichia coli*. Its thermal denaturation temperature above 100°C was observed at neutral pH and confirmed to have enough thermostability for PCR method, and to retain almost the same binding property as the wild type. Coexistence of the highly stabilized mutant at its appropriate concentration during PCR was shown to be effective in shortening the extension reaction time, but the presence of higher concentration of the mutant decreased the PCR product. DSC analysis indicated that it was mainly caused by the destabilizing effect of the CSP on the double stranded DNA structure formation and that it is important to design the mutant to show sharper thermal dissociation of the CSP-DNA complex for PCR application.

研究分野：蛋白質物性

キーワード：蛋白質核酸相互作用 分子設計 高安定化 一本鎖核酸 PCR 熱測定 アニーリング 熱解離

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

共存させる PCR プライマーによって、DNA 鎖の特定の部分 (あるいは全体) を指数関数的に増幅させる PCR 法は、遺伝子診断から蛋白質工学まで幅広く利用される重要な手法であるが、PCR プライマーや熱解離した DNA などの一本鎖 DNA が分子内および分子間で自発的に様々な高次構造を形成するため、期待通りの PCR 産物が得られない場合が少なくない。このため、一本鎖結合蛋白質 (SSB) を共存させる方法も提案されているが、一般に SSB は熱安定性が低く、PCR 反応の途中で容易に失活してしまう問題点があった。我々は、一本鎖 DNA に強い結合性もつ高度好熱菌由来の低温ショック蛋白質 (CSP) の 2 アミノ酸変異体を設計し、分子表面に 1 本のジスルフィド結合を導入することで、野生型よりも高い安定性と高い結合性を得ることに成功したが、まだ PCR 反応で通常求められる 100 を超える熱変性温度は持っていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、CSP にさらに多くのアミノ酸変異を合理的分子設計により導入することで、PCR 法に用いるのに十分と考えられる、中性 pH で 100 を超え、かつ野生型と同等以上の、一本鎖への高い結合性を兼ね備えた変異体 CSP を創成することをめざした。また、これらの変異体を用いて、実際に PCR 反応への共存の効果を確かめることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高安定化変異体の分子設計

PDB に公開されている CSP の立体構造に基づいて、全アミノ酸残基をシステインに置換した場合の硫黄原子の平均的な空間位置を推定し、立体構造を保ったままで、各残基間にジスルフィド結合を形成することが可能かを、推定した硫黄原子間の距離によって判定した。また、オリゴ DNA との複合体立体構造に基づいて、DNA 結合に関与するアミノ酸残基やこれに隣接するアミノ酸残基や分子内部に埋もれているアミノ酸残基については、アミノ酸置換の候補から除外した。

#### (2) 変異体の生合成と精製

N 末に His タグをつけた CSP の遺伝子を組み込んだ発現ベクターに、常法により PCR によって設計したアミノ酸置換を導入し、変異プラスミドの CSP コード部分の塩基配列を読むことで、導入した部位以外に変異が入っていないことを確認し、発現用大腸菌を形質転換した。プラスミドが組み込まれた大腸菌を大量培養・破碎し、高濃度グアニジン塩酸と還元剤 DTT を含む溶液で変性・可溶化させた蛋白質を、Ni カラムを用いて His タグを利用して精製した。変性剤と還元剤の濃度を徐々に下げることで、分子内のジスルフィド結合形成と立体構造の巻き戻し反応を同時に行い、最終溶液を十分に透析し、SDS ゲル電気泳動で純度を確認した。

#### (3) 蛍光滴定法による有効蛋白質濃度係数と結合定数の評価

CSP と 1 対 1 で強く結合する 7 塩基オリゴ DNA に対する 7 塩基の一本鎖オリゴ DNA を、変異体 CSP 溶液に滴下して CSP に結合させ、CSP の唯一のトリプトファン残基の蛍光が核酸との結合で消光する現象を用いて、結合の飽和曲線を得る。これを解析することで、変異 CSP の有効蛋白質濃度係数 (DNA への結合能を持つ分子の割合) と結合定数とを評価した。

#### (4) DSC による熱安定性の評価

酢酸およびリン酸緩衝液を用いて、酸性から中性 pH での、変異体 CSP の熱変性を、高精度 DSC 装置 (MicroCal VP-DSC) を用いて測定した。すべての条件で、連続した 2 回の昇温を行うことで可逆性を確認するとともに、いくつかの条件では、昇温速度を変えることで、昇温速度依存性を評価した。可逆的かつ各温度で熱平衡に到達している酸性から弱酸性条件のデータについては、複数の pH のデータを用いて、グローバル解析を行い、熱転移の中間状態の有無や熱転移に伴う熱力学量 (転移温度、転移エンタルピー、転移エントロピーなど) を評価し、アミノ酸変異に対する熱力学量変化を定量的に求めた。

#### (5) PCR 反応への変異 CSP 共存の効果

市販の 2 種類の PCR キットを用い、日常的に研究室で行っている PCR 反応について、共存させる変異体 CSP の濃度と、PCR のアニーリング・伸長反応時間を変化させて、PCR 後の産物の量をアガロース電気泳動で評価した。

#### (6) DNA の熱変性への変異 CSP 共存の効果

中性 pH で、低温では 3 重螺旋構造を形成し、温度を上げることで、2 重螺旋構造、変性解離状態へと熱転移を示すオリゴ DNA 鎖を試料とし、この熱転移への変異 CSP 共存の効果と、DSC 測定により評価した。DNA に対して共存させる変異 CSP の量比を変えることで、この DNA が形成する高次構造安定性への変異 CSP 共存の効果が評価できる。

#### (7) オリゴ DNA ・変異 CSP 複合体の熱解離反応の DSC 測定

低温で 2 重螺旋 (ヘアピン) 構造を形成するオリゴ DNA と変異 CSP 複合体の DSC 測定を行うことで、変異 CSP が立体構造を保ったまま、蛋白質から DNA が解離する、熱解離反応を観測した。これから、熱解離に伴う熱力学量 (熱解離温度、熱解離エンタルピー、熱解離エントロピーなど) を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高い結合性を示す高安定化変異 CSP の創成

まず、立体構造に基づいて、高安定性と高結合性を実現すると期待される 2 本のジスルフィド結合を導入し、大腸菌で大量発現・精製し、pH 7.0 で 100 以上の熱変性温度を示し、PCR 法への使用に十分な熱安定性を持つこと、および野生型と同等の一本鎖 DNA への結合性を保持することを確認した。最終年度には、さらにもう 1 本のジスルフィド結合を導入した 6 変異体を設計・発現・精製し、結合性は 4 変異体よりも多少減少するものの、より高い熱転移温度を示すことを明らかにした。

##### (2) 高温での可逆的なオリゴマー形成状態の発見

CSP のような単量体の小さな球状蛋白質では、従来、可逆的な熱変性であれば、会合体は形成せずに単量体の変性状態との平衡として熱力学的に扱えると考えられてきた。しかしながら、本研究の過程で、蛋白質の野魚戸依存性を測定することで、高温で可逆的なオリゴマーを形成する可能性が示唆され、実際に数種類の蛋白質で、4 量体程度の会合体が高温で可逆的に形成されることがわかった。これは、予期しなかった研究成果であるが、従来から知られていた不可逆な会合体形成の前駆体である可能性があり、今後の研究の発展が期待される。また、熱安定性の評価には、このような可逆的な会合体形成の可能性についても考慮することが必要であることがわかった。

##### (3) PCR 反応への効果

PCR 法の際に、高安定化変異体蛋白質を適度な濃度で共存させることで、特に伸張反応の時間短縮などに効果があることを確認したが、高濃度で共存させると PCR 産物が減少することがわかった。この原因を探るため、DNA 二重螺旋構造や三重螺旋構造への CSP の共存の効果を確認したところ、三重螺旋構造だけでなく、二重螺旋構造も不安定化する効果を持つことがわかった。PCR 反応に応用するには、低温での一本鎖 DNA への結合性を保ちながら、アニーリング温度での DNA の 2 重螺旋構造形成を阻害しないよう、結合性の温度によるオン・オフ制御が必要であると考えられる。

##### (4) 蛋白質核酸の熱解離反応の直接測定成功

変異体 CSP の前項の性能を評価するため、一本鎖 DNA と CSP の複合体の熱解離反応を DSC 測定で直接観測することに成功した。蛋白質・核酸相互作用では、従来から等温滴定熱量測定法 (ITC) が用いられているが、正しい解析モデルを用いないと正確な解離熱力学量の解析ができないという欠点があった。今回開発した方法では、原理的に、解離の熱力学量 (解離ギブズエネルギー、解離エンタルピーなど) の温度依存性を高精度でモデルを用いずに測定できる可能性がある。本研究では、一本鎖 DNA の塩基配列を低温でヘアピン構造を形成するように設計することにより、定量的な測定法を確立した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Islam Mohammad M., Kobayashi Kei, Kidokoro Shun Ichi, Kuroda Yutaka	4. 巻 286
2. 論文標題 Hydrophobic surface residues can stabilize a protein through improved water?protein interactions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4122 ~ 4134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tumhom Suthipapun, Krusong Kuakarun, Kidokoro Shun-ichi, Katoh Etsuko, Pongsawasdi Piamsook	4. 巻 652
2. 論文標題 Significance of H461 at subsite +1 in substrate binding and transglucosylation activity of amyloamylase from <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 3 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2018.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Shigeyoshi, Kidokoro Shun-ichi	4. 巻 1964
2. 論文標題 Protocols of IATC, DSC, and PPC: The Multistate Structural Transition of Cytochrome c	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 17 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9179-2_2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nami Ikarashi, Hayato Kono, Akiko Nakazawa, Shun-ichi Kidokoro
2. 発表標題 Thermodynamic evaluation of molecular chaperone function of cold shock protein for nucleic acids with its highly stabilized mutant
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城所 俊一、五十嵐 奈美、光野 颯斗、中澤 晶子
2. 発表標題 高安定化した低温ショック蛋白質の一本鎖DNA鎖からの熱解離反応のDSC測定
3. 学会等名 第 5 4 回熱測定討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城所俊一
2. 発表標題 高安定化変異体を用いた、低温ショック蛋白質の分子シャペロン機能の熱力学的評価
3. 学会等名 第 1 8 回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤弘章、中澤晶子、山本航平、城所俊一
2. 発表標題 高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8由来低温ショック蛋白質の埋もれたアスパラギン酸の示す強力な立体構造安定化効果
3. 学会等名 第 5 5 回熱測定討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Makoto Suzuki et al.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 353
3. 書名 ATP Hydrolysis Energetics, in The Role of Water in ATP Hydrolysis Energy Transduction by Protein Machinery	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----