

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07368

研究課題名(和文) タンパク質構造形成における重要部位探索とその進化における選択要因解明

研究課題名(英文) Search for important sites in protein structure formation and elucidation of selection factors in their evolution

研究代表者

高野 和文 (Takano, Kazufumi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：40346185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸置換とタンパク質の機能/構造との関係に関する幅広い知識を得るために、「超好熱性タンパク質」を使用して「ランダム突然変異」によって「可変または致命的な部位」を抽出した。使用したタンパク質は、*Sulfolobus tokodaii* (Sto-Est) のエステラーゼと *Thermococcus kodakarensis* (Tk-Sub) のサチライシンである。これらのタンパク質のランダム変異の活性と配列に関する広範な公開データと未公開データも利用した。本研究により、変異可能な保存されたサイトと、変異に適さない非保存サイトの特性の一部が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日、タンパク質の構造構築メカニズムに関して、計算機を用いた研究が増加してきているが、実験を通して得られる知見もまだまだ多くある。特に本研究のような網羅的解析が有効である。本研究は、研究代表者がこれまで行ってきた個々のタンパク質の安定性・フォールディング研究から構造構築網羅的解析、物性と進化の関係も含んだ新たな研究を展開するものである。

研究成果の概要(英文)：In this work, in order to get broader knowledge on the relationship between amino acid substitutions and protein function/structure, we attempted to extract 'mutable and fatal sites' by 'random mutation' using 'stable hyperthermophilic proteins'. The proteins applied were an esterase from *Sulfolobus tokodaii* (Sto-Est) and a subtilisin from *Thermococcus kodakarensis* (Tk-Sub). These proteins have been well studied for their function, structure and stability, and have also been used in random mutation experiments; we have extensive published and unpublished data on the activity and sequence for random mutations of these proteins. This study has revealed a portion of the properties at conserved sites that can be mutated and non-conserved sites that are not suitable for mutation.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生命活動に不可欠なタンパク質は、そのアミノ酸配列に起因して特異的な立体構造を形成し機能を発揮する。また、タンパク質は生物進化の過程でアミノ酸変異を繰り返し・蓄積しており、相同タンパク質で知られるように、同じ機能のタンパク質は類似のアミノ酸配列と構造を有する。この相同タンパク質のアミノ酸配列アライメントでは、部位によりアミノ酸の保存度が異なる。一般に、保存度の高い部位は機能・構造に重要で、保存度の低い部位はアミノ酸置換が可能であると考えられる。しかし、保存度の低い部位でも安定性低下を引き起こす致命的変異があること、重要でない部位でも進化の過程で変異が生じずに保存されていることが先行研究から分かった。つまり、配列アライメントから機能・構造に重要な部位を特定することは困難で、実験による検証を通して重要部位の探索・同定をする必要がある。

### 2. 研究の目的

タンパク質の立体構造形成における重要部位(残基)を同定する新たな手法を提唱し、その部位を実験的に特定する。

具体的には、タンパク質に強制的にアミノ酸変異を導入・蓄積させ、致命的部位(変異不可能部位)を抽出する。さらに、活性・安定性・構造形成能などで変異体をスクリーニングすることで、『タンパク質進化』における優位な選択要因を探知する。

### 3. 研究の方法

本研究室で進めている分子進化研究を応用し、新たなタンパク質の立体構造形成における重要部位探索法の構築を行う。モデルとして、好熱性タンパク質である Tk-sub と Sto-Est を用いて、ランダム変異を導入する進化実験を行い、不活性変異体の同定や変異体ライブラリー・相同タンパク質配列アライメントの比較から、重要部位の同定が可能か実証するとともに変異部位と配列アライメントとの関係を調査する。

具体的には、エラープローン PCR を用いたランダム変異により、タンパク質に変異を導入し、活性・安定性(熱処理後の残存活性)・構造形成能などを指標に、変異可能部位、致命的部位を抽出する。

### 4. 研究成果

Tk-sub と Sto-Est のランダム変異体の解析から、変異可能部位と保存度の関係(図1)と致命的部位と保存度の関係(図2)を得た。これらの得られた情報から、高保存度部位の変異が失活に繋がり、低保存度部位の変異は活性に影響しないという一般論通りの結果も得られた一方、一部の高保存度部位の変異は活性に影響しないこと、低保存度部位の変異でも失活に繋がる場合があることが明らかとなった。特に、高保存度部位では、タンパク質外部の疎水性アミノ酸が変異に寛容であること(図3)や、低保存度部位でも  $\alpha$ -ヘリックスに關与するアミノ酸は致命的部位になり有ることなどの知見が得られた。

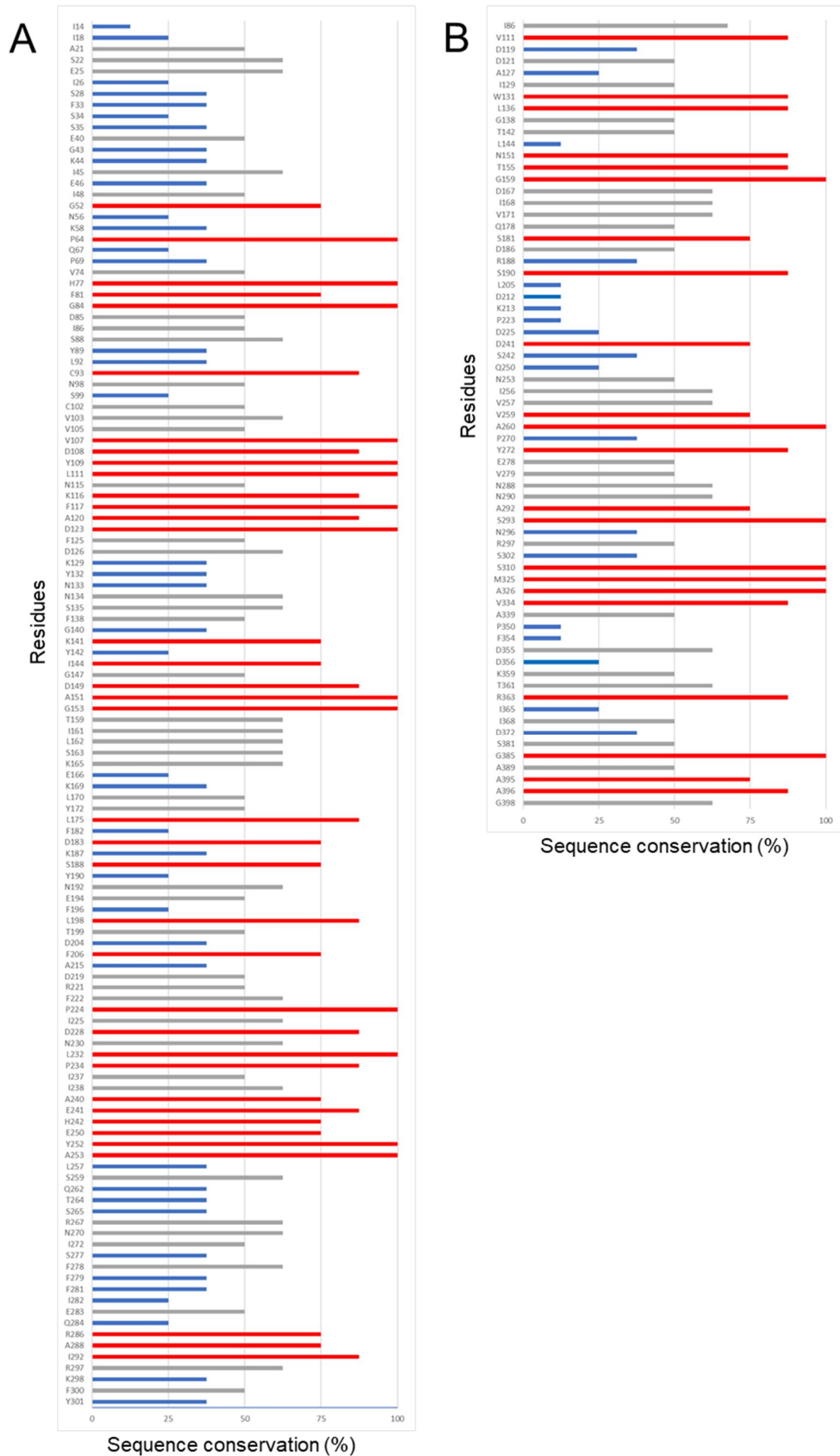


図 1 . 変異可能部位と保存度の関係。(A)Sto-Est、(B)Tk-Sub。

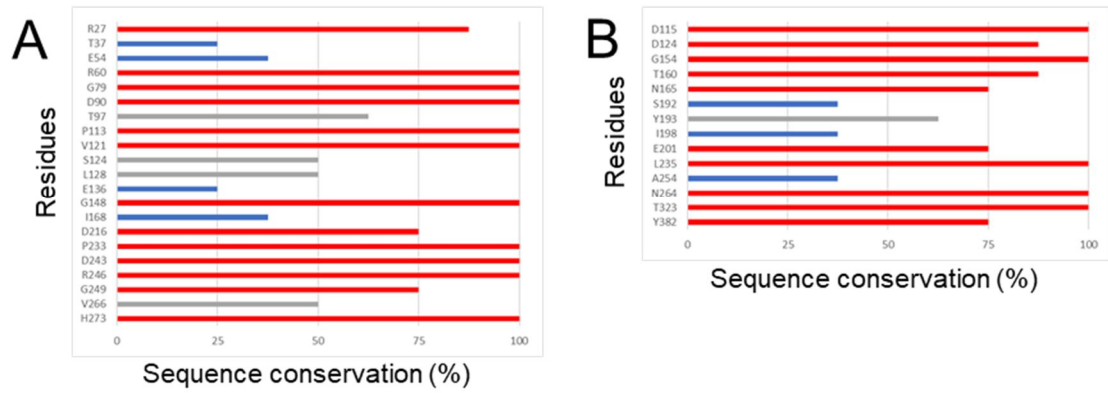


図2 . 致命的部位と保存度の関係。(A)Sto-Est、(B)Tk-Sub。

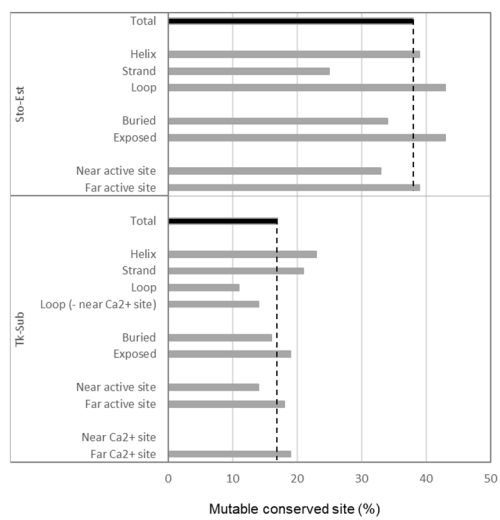


図3 . 変異可能な保存部位の割合

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ota, N., Kurahashi, R., Sano, S. & Takano, K.	4. 巻 150
2. 論文標題 The direction of protein evolution is destined by the stability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 100-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.006">https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.05.006</a>	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 -
1. 著者名 Kurahashi, R., Tanaka, S.-i.. & Takano, K.	4. 巻 128
2. 論文標題 Activity-stability trade-off in random mutant proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 405-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.017">https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.03.017</a>	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 -
1. 著者名 Kurahashi, R., Sano, S. & Takano, K.	4. 巻 86
2. 論文標題 Protein Evolution is Potentially Governed by Protein Stability: Directed Evolution of an Esterase from the Hyperthermophilic Archaeon <i>Sulfolobus tokodaii</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Evolution	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s00239-018-9843-y">https://doi.org/10.1007/s00239-018-9843-y</a>	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 -
1. 著者名 Kurahashi, R., Tanaka, S.-i.. & Takano, K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Highly active enzymes produced by directed evolution with stability-based selection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Enzyme and Microbial Technology	6. 最初と最後の頁 109626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109626">https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109626</a>	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 太田夏子、倉橋亮、佐野智、高野和文
2. 発表標題 タンパク質進化の方向を決定づける安定性
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 R. Kurahashi, S. Tanaka, S. Sano, H. Matsumura, K. Takano
2. 発表標題 Protein stability potentially governing protein evolution
3. 学会等名 SMBE (Society of Molecular Biology & Evolution) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉橋亮、太田夏子、高野和文
2. 発表標題 タンパク質進化の命運を握る安定性
3. 学会等名 日本進化学会第20回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Mizutani, R. Kurahashi, S. Tanaka, K. Takano
2. 発表標題 Empirical search for important sites in protein structures
3. 学会等名 JSBBA KANSAI 5th Student Forum
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷颯、倉橋亮、田中俊一、高野和文
2. 発表標題 アミノ酸変異が及ぼすタンパク質機能への影響と配列保存度の関係
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第507回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田夏子、倉橋亮、佐野智、高野和文
2. 発表標題 タンパク質の進化過程における安定性の役割
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉橋亮、佐野智、高野和文
2. 発表標題 タンパク質進化を潜在的に支配する安定性
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田夏子、倉橋亮、佐野智、高野和文
2. 発表標題 タンパク質進化の配列空間探索に及ぼす安定性の影響
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉橋亮、佐野智、高野和文
2. 発表標題 タンパク質進化を潜在的に支配する安定性～タンパク質工学への応用に向けて～
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉橋亮、田中俊一、高野和文
2. 発表標題 ランダム変異浮動におけるタンパク質の活性と安定性のトレードオフ
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Kurahashi, S.-i. Tanaka, K. Takano
2. 発表標題 Exploration of an Efficient Way to Obtain High Activity Protein by Stability Selection
3. 学会等名 Thermophiles 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----