

平成 23 年 5 月 31 日現在

機関番号： 8 2 4 0 1

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20589003

研究課題名（和文）

超好熱菌タンパク質の熱安定化に及ぼす静電的相互作用の役割

研究課題名（英文）

Contribution of electrostatic interaction to thermo-stabilization of proteins from hyperthermophile

研究代表者

松浦 祥悟 (MATSUURA YOSHINORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・リサーチアソシエイト

研究者番号： 50513462

研究成果の概要（和文）：

超好熱菌由来蛋白質には多くのイオン性残基が存在する。しかし、その静電的相互作用が熱安定化にどのような役割を果たしているか殆ど分かっていない。本研究では、変性温度が約 150 度という史上最高の熱安定性を示す超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 CutA1 (*PhCutA1*) をモデル蛋白質として用い、イオン性残基がどのように熱安定性に寄与しているかを 50 種以上のイオン性残基変異型 *PhCutA1* を用いて検討した。

研究成果の概要（英文）：

Proteins from hyperthermophiles contain a lot of ionic residues compared to those from other sources growing in moderate environments. However, the contribution of ionic interaction to thermo-stability of the proteins remains to be clearly understood. The CutA1 protein from hyperthermophile, *Pyrococcus horikoshii* (*PhCutA1*) shows the highest denaturation temperature of nearly 150 °C. In this report, we investigated the thermo-stabilities of more than 50 *PhCutA1* mutants (from ionic to non-ionic residues) to elucidate the contribution of the ionic interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	0	1,100,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	510,000	3,310,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード： (1) 蛋白質の熱安定性 (2) 蛋白質工学 (3) 塩結合 (4) 超好熱菌
(5) 静電的相互作用 (6) イオン性アミノ酸 (7) CutA1 (8) DSC

1. 研究開始当初の背景

2006年に、我々は、超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 CutA1(*PhCutA1*)の変性温度 (T_d)が中性付近において約 150°Cであることを発見した。この変性温度は、これまでに報告された実測値より約 30°C高い史上最高のものである(*FEBS Let.* (2006) **580**, 4224)。

CutA1は大腸菌で最初に同定されており、好熱菌・植物・ヒトに至る種々の生物に存在していることが分かっている。CutA1はバクテリアでは二価カチオン耐性に関わることが知られているが、その機能はまだよく分かっていない。様々な生物種に由来する CutA1の立体構造が既に解析されており、同一サブユニットからなる3量体構造であることが分かっている。CutA1の立体構造の特徴として、3量体の中心部で各サブユニットの β シートを絡み合うように共有しており、そのまわりを α ヘリックスのラセン構造が覆っている。この共通する立体構造が、生育至適温度を遥かに超える高い熱安定性を保持している理由と思われる。このため、常温生物由来の CutA1ですら T_d が 100°C近くになる。

*PhCutA1*の異常に高い熱安定性のメカニズムを調べるため、各生物種由来 CutA1の立体構造が比較された。その結果、*PhCutA1*の高い熱変性温度はCutA1共通の基本構造に加え、他生物種のCutA1と比較して異常に多く含まれているイオン性残基の静電的相互に起因すると推定されている。これらの結果は、静電的相互作用による高温での熱安定化機構を調べるには、*PhCutA1*は格好のモデル蛋白質であることを示している。

2. 研究の目的

一般に、生育至適温度の上昇に従って蛋白質の解離性残基含有率が上昇することは統計的に示されている。そのため、蛋白質の熱安定性にとって、イオン性残基が重要な役割を果たしていると考えられているが、その熱安定化機構の詳細は解明されていない。我々は、*PhCutA1*を用いて、イオン性残基が蛋白質の熱安定化に果たしている役割を解明することを目的とした。

また、相補的な検証として、安定性の低い常温菌由来の大腸菌 CutA1(*EcCutA1*)のアミノ酸残基置換による熱安定性上昇を試みることで、*PhCutA1*の異常に高い熱安定性メカニズムを実証的に裏付ける方法も並行して進める。

3. 研究の方法

PhCutA1(T_d =約 150°C)と *EcCutA1*(T_d =約 90°C)の立体構造から安定化因子の差異を調べたところ、*PhCutA1*は3量体のサブユニット間ではなく、単量体内の5Å以内のイオン結合数が極端に多い

(*PhCutA1*は30本、*EcCutA1*は1本である)ことが分かった。これらのイオン結合がサブユニット間イオン結合とネットワークを構成して、*PhCutA1*の分子表面をイオン結合の層で覆っている。イオン性残基の数は、*PhCutA1*では102残基中43、*EcCutA1*では112残基中25である。計画した*PhCutA1*変異型は次のとおりである。

①4Å以内の全てのイオン結合を形成している Glu 及び Asp をそれぞれ Gln と Ala 及び Asn と Ala に置換する。②*PhCutA1*に存在する全てのイオン性残基を対象に、静電的相互作用の理論値をその構造配置から FoldX (後述)を用いて算出し、計算値の上位10、下位10残基についてのアミノ酸残基置換を行う。理論計算とアミノ酸残基置換による安定性変化がどの程度実測値との間に差がでるか、その差の原因を明らかにすることが本研究課題の解決につながると思える。変異型の作製は、①の項以外では、GluはGln、AspはAsn、LysとArgはAla、その他安定化の評価に必要と思われた場合には違ったアミノ酸残基に置換する。また、イオン対残基の二重または四重変異型などを作製する。作製した変異型を Table 1 に示す。各変異型蛋白質を大腸菌にて発現させ、精製を行った。熱安定性の変化は DSC (Differential Scanning Calorimeter: 示差走査熱量計)にて測定することで評価した。*EcCutA1*の安定化の試みに関しても、アミノ酸残基を置換した変異型を作製して精製を行い、同様に DSC により熱安定性の評価を行った。

Table 1 *PhCutA1* 変異型蛋白質の変性温度

mutants	ΔT_d	mutants	ΔT_d	mutants	ΔT_d
E12Q	0.7	E71A	-0.5	R36A	-1.9
E15A	-0.8	E71Q	-1.5	R58A	-6.8
E15Q	-0.1	E99A	1.5	R68A	-2.1
E24A	-3.0	E99Q	6.4	R82A	-10.0
E24Q	-1.7	D48N	2.7	K19A	-2.6
E34Q	-1.4	D60A	-3.3	K49A	1.0
E42Q	4.9	D60N	-3.5	K66A	-6.5
E46Q	3.6	D76N	0.9	K70A	-3.4
E47A	-2.5	D84A	-1.5	K101A	-4.4
E47Q	-1.1	D84N	-0.5	R25A/E99Q	-2.4
E59Q	3.7	D86N	2.5	R58A/D60N	-6.8
E63A	0.5	D87N	-7.0	R68A/E24Q	-2.3
E63Q	-1.5	D91A	-6.6	K70A/D91N	-5.1
E64A	-2.9	D91N	-8.4	K66A/D87N	-9.9
E64Q	-3.5	R25A	-12.4	K101A/E64Q	-3.2
E67A	0.5	R33A	-9.2	E15Q/K19A/	
E67Q	-0.5	R33M	-7.7	R36A/E47Q	-2.8

4. 研究成果

(1) *PhCutA1* イオン性残基変異型の熱安定性変化

PhCutA1 は3量体であるため、サブユニット内・サブユニット間・及びイオンネットワークを形成するアミノ酸残基に区分して検討する。負荷電アミノ酸残基を置換した変異型に関して、サブユニット内のイオン対変異型(E24A/Q, D60N/A, E63A/Q, E64A/Q, E71A/Q, D84A/N, E99A/Q)の T_d は-4 から +6°C の温度範囲で変化した。サブユニット間変異型(E15A/Q, D91A/N)の T_d は-8 から-1°C、サブユニット内サブユニット間両方に亘るイオン対変異型(E47A/Q, E67A/Q)の T_d は-3 から-2°C の温度範囲で変化した。これらの変異型の中でも、E99Q 変異型では、予想に反して T_d が6°C程度上昇した。この結果は T_d が約 150°C という非常に熱安定性の高い *PhCutA1* においても、熱安定性にとって不都合な静電相互作用が存在していることを示している。このため、*PhCutA1* の T_d を更に上昇させることも可能であると考えられる。このことは、「蛋白質変性温度の上限」という蛋白質の熱安定性にとって、基本的で重要な点での発見である。

一方、正荷電アミノ酸残基を置換した変異型では、サブユニット内のイオン対変異型(K19A, R25A, K49A, R58A, R68A, K101A) の T_d は-12 から+1°C、サブユニット内サブユニット間両方に亘るイオン対変異型(R36A, K66A, K70A, R82A) の T_d は-10 から-3°C の温度範囲で変化しており、負荷電アミノ酸残基を置換した場合よりも T_d が低下する傾向を示した。熱安定性にはイオン基以外の部分からも著しい影響を受けるが、それらは後で議論することにして、表面的には *PhCutA1* の熱安定性においては正荷電アミノ酸残基による影響が大きいことが示唆された。これらの変異型の中でも、R25A 変異型は一残基置換で T_d が 12°C程度減少していた。Arg25 は上述した Glu99 と比較的近傍に存在しており、残基間での強い静電相互作用が考えられた。そこで R25A/E99Q 二重変異型を作製して T_d の変化を調べた結果、 T_d は僅かに 2°C程度の減少にとどまった。そのため、*PhCutA1* において、Glu99 と Arg25 の静電相互作用が安定性に寄与しているわけではなく、Glu99 が周辺の負荷電残基と反発し、*PhCutA1* の不安定化に寄与していることが示唆された。Arg25 は Glu99 との静電相互作用により、不安定化を相殺していたと考えられる。

また、*PhCutA1* 内でイオン対を形成していると予想される正負荷電アミノ酸残基を同時に非荷電アミノ酸残基に置換することでイオン対消失の影響を調べたところ、R58A/D60N, R68A/E24Q, K70A/D91N, K66A/D87N, K101A/E64Q 変異型の T_d はそれ

ぞれ約-10 から-2°Cの温度範囲で変化していた。さらに、サブユニット内サブユニット間両方に亘り、イオンネットワーク形成している残基の変異型、E15Q/ E47Q/D91N/D87N の T_d は7°C減少した。そして、サブユニット内で同じ二次構造内のイオン対を全て削除(14箇所の変異で9本のイオン対削除)した変異型(E12Q/K16A/K44A/E46Q/D48N/K49A/R58A/D60N/E63Q/E67Q/E71Q/D84N/E90Q/K94A)の場合では、 T_d は約7°Cの減少にとどまった。いずれも、一残基置換体と比較して顕著な安定性低下は見られなかった。

PhCutA1 に含まれるイオン対の数は非常に多く、多少のイオン対削除が生じてても他のイオン対が補完するため、顕著な安定性の低下が見られないことが明らかとなった。どのような必要性から超好熱菌蛋白質にはイオン性アミノ酸残基が多いのかまだ原因をつかめていないが、本研究で50種以上の変異型を作製したので、次に、各残基の静電的相互作用のエネルギーと安定性変化の関係を検討する。

(2) FoldXによる検証

PhCutA1 に存在する各イオン性残基の静電的相互作用のエネルギーは、Web上で公開されている FoldX(<http://foldx.crg.es/>)によって計算した。FoldXは、蛋白質の立体構造情報を用いて、望む変異型の立体構造モデリングや各種安定化エネルギーの定量的評価をできるプログラムである。まず、野生型について各イオン性残基の静電的相互作用のエネルギーを評価し、それらの上位10残基と下位10残基程度(下位とはイオンが反発して蛋白質の不安定化に寄与している残基)を選んだ。熱安定性に寄与していると推定されたイオン性残基中で Glu34 は見かけ上、イオン結合を形成していないので、これまで変異型候補に上らなかった。そこで、新たにE34Q変異型を作製した。また、不安定化に寄与していると推定された残基では、新たにE12Q, D48N, E46Q, D76N, R33A(/M)変異型も作製して精製を行い、 T_d をDSCにより測定した。FoldXで予測された安定化に寄与しているイオン性残基の変異型がDSC測定で安定性を低下させ、逆に不安定化に寄与していると予測されたイオン残基の変異型が安定化すれば、FoldXの予測が正解であり、イオンによる熱安定化の問題は解決されることになる。しかし、Fig. 1に示すように、変異に伴う変性温度の差(ΔT_d)とFoldXから求めたイオン残基の静電エネルギーとの相関係数は0.46である(Fig. 1)。更に、FoldXから評価された置換による安定性の変化の差(ΔG)との相関は0.64で、わずかに相関が改善されたようにみられる。このことは、当然のことながら、イオン性アミノ酸残基の置換はイオン基以外の部分が安定性に大きく寄与していることを示す。推定から外れた部分をイオン基以外のどのような因子で安定性に影響を与えているかを定量的に説明することが本研究課題のゴールである。しかし、個別に検討してみると、現状では多くの説明不可能な部分を残しており、

E99QとR33A(M)変異型において予測と実験結果(ΔT_d)に著しい差異が見られた。E99Q変異型では熱安定性の低下を予測していたが、上述の通り、熱安定性は増加した。Arg33は3量体の中心に位置しているため、各サブユニットに位置するArg33残基が互いに反発し、不安定化に寄与していると予測された。そのため、変異型の熱安定性は増加すると予測したが、R33A(M)の T_d は約8°C低下した。現状では、その矛盾が解明できていない。

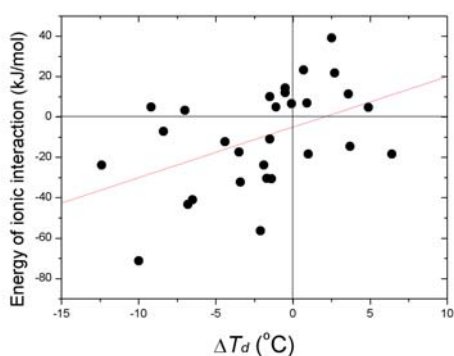


Fig. 1 野生型と変異型 *PhCutA1* の変性温度の差 (ΔT_d)と FoldX により算出した野生型における各イオン性残基の静電エネルギーの関係

(3) *EcCutA1* 熱安定性向上の試み

EcCutA1 への変異導入によって熱安定化を向上させることは、*PhCutA1* の高い熱安定性メカニズムの解明の有力な手法の一つである。

まず、太田らが開発した SPMP(**S**tability **P**rofiles of **M**utant **P**rotein)を用いて、置換により安定性の改善が予想されるアミノ酸残基の候補をいくつか選出した。SPMPは蛋白質の立体構造を基礎にしたデータベースを用いて、一残基置換による安定性変化を予測するプログラムである(Ota et al. *Protein Eng.*, 14,557(2001))。各変異型を精製後、熱安定性を測定した。その結果、野生型 *EcCutA1* の T_d は pH9 において約 90 °C であるが、S11A で 17°C、E59L で 10°C、E61V により T_d が 14°C の上昇させることに成功した。最も安定性が向上した変異型(S11V/E61V/Q73V)では、 T_d が約 117°C であり野生型に比べ29°Cの改善が見られた(Fig. 2)。これらの変異による熱安定性の上昇は基本的に加算性を示した。

さらに、 T_d が約 14°C, 24°C 増加した *EcCutA1* E61V, S11V/E61V 変異型蛋白質に関して X線立体構造解析を行った結果、約 2.3 Å の分解能で解析することができた(PDB ID: 3AA9, 3AA8)。得られた結晶構造を用いて再度 SPMP 法による評価を行った結果、S11V は側鎖間相互作用、水和、局所構造、E61V は主に局所構造が改善されたことにより熱

安定性が上昇していることが示唆された。そして、SPMP 法により選出した *EcCutA1* アミノ酸残基変異型に関する論文の中で、高い熱安定性変化の原因を X線結晶構造解析により得られた立体構造を用いて定量的に明らかにすることができた。

次に、分子表面の荷電間相互作用エネルギーの最適化を基盤にした熱安定化のコンピュータ検索プログラム(TKSA-GA法)を用いた(Samantha et al., *Biochemistry*, 45,2761 (2006) Makhataze 教授の支援による)。熱安定性を上昇させる対象は、*EcCutA1* S11V/E61T 変異型($T_d=112^\circ\text{C}$)とした。順次安定性の向上が予測された E21K/E59K, S105K, Q74K, A22K, N8E, T101K, A75K, A10K, V70K 変異型の T_d を調べた結果、108-113°C の温度範囲で変化し、予測に反して安定性が向上しなかった。

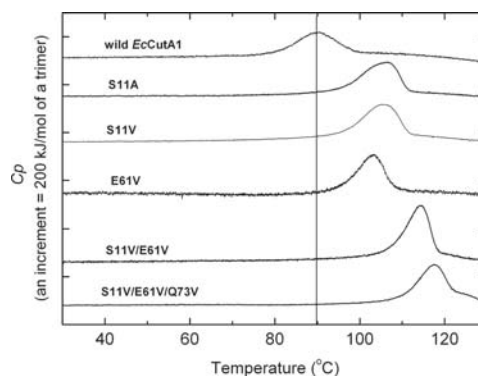


Fig. 2 SPMP により選出した *EcCutA1* 変異型蛋白質の DSC 曲線 (論文①より転載)

(まとめ)

超好熱菌由来蛋白質には、異常に多くのイオン性残基が含まれているが、これらのイオン性残基がどのような機構で熱安定化に寄与しているかはまだ明らかになっていない。そこで、本研究課題では、史上最高の熱安定性を示し、多くのイオン性残基を有する *PhCutA1* をモデル蛋白質として、超好熱菌蛋白質の熱安定化に及ぼす静電的相互作用の役割を明らかにすることを目的とした。本研究で、*PhCutA1* に含まれるイオン性残基の系統的で網羅的なアミノ酸置換変異型の安定性変化の結果とこれまで築き上げられた理論的予測との差異を網羅的に抽出することができた。ここで得た理論通りに安定性が変化しない変異型が、どのような原因で期待通り変化しないかを解明することによって、静電的相互作用の熱安定化の理解が進む。また、熱安定性予測の精度向上が可能になり、蛋白質熱安定化への重要な設計指針を得ることができる。本研究の内、*EcCutA1* の熱安定化の試みでは、これまでに既に 29°C の変性温度上昇に成功しており、今後、この手法による発展が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Y. Matsuura, M. Ota, T. Tanaka, M. Takehira, K. Ogasahara, B. Bagautdinov, N. Kunishima and K. Yutani :
"Remarkable improvement in the heat stability of CutA1 from *Escherichia coli* by rational protein design"
J Biochem., 148, 449-458, (2010) 査読有
- ② M. Sugahara, Y. Asada, K. Shimizu, H. Yamamoto, N. K. Lokanath, H Mizutani, B. Bagautdinov, Y. Matsuura, M. Taketa, Y. Kageyama, N. Ono, Y. Morikawa, Y. Tanaka, H. Shimada, T. Nakamoto, M. Sugahara, M. Yamamoto and N. Kunishima:
"High-throughput crystallization-to-structure pipeline at RIKEN SPring-8 Center"
J. Struct. Fund Genomics, 9, 21-28, (2008) 査読有
- ③ B. Bagautdinov, Y. Matsuura, S. Bagautdinova, N. Kunishima and K. Yutani:
"Crystal structure of putative CutA1 from *Homo sapiens* determined at 2.05 Å" *Acta Cryst.*, F 64, 351-357 (2008) 査読有
- ④ B. Bagautdinov, Y. Matsuura, S. Bagautdinova, and N. Kunishima: "Protein biotinylation visualized by a complex structure of biotin protein ligase with a substrate" *J Biol Chem.*, 283, 14739-14750, (2008) 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 松浦 祥悟、竹平 美千代、田中 智之、国島 直樹、油谷 克英:
"理論的に推定された静電相互作用のタンパク質熱安定化への寄与の検証: 超好熱菌由来蛋白質 *PhCutA1* の場合"
第11回日本蛋白質科学会年会.
2011年6月7日、吹田市
- ② Y. Matsuura, M. Takehira, M. Ota, T. Tanaka, K. Ogasahara, N. Kunishima, and K. Yutani:
"Does hydrophobic interaction due to hydration contribute to protein stability even over 100 °C?"
7th Asian Biophysics Association Symposium
2011年2月1日、New Delhi
- ③ Y Matsuura, M. Ota, T. Tanaka, M. Takehira, K. Ogasahara, N. Kunishima and K Yutani;
"Calorimetry of Heat-Reversible CutA1

Proteins with a Denaturation Temperature Higher than 100°C"

ICCT-2010

2010年8月4日、つくば市

- ④ 松浦 祥悟、竹平 美千代、田中 智之、太田元規、国島 直樹、油谷 克英 :
"大腸菌由来 CutA1 変異型の熱変性の熱力学的解析"
第10回日本蛋白質科学会年会
2010年6月17日、札幌市
- ⑤ Y. Matsuura, M. Ota, M. Takehira, B. Bagautdinov, N. Kunishima and K. Yutani :
"Remarkable improvement of the heat stability of CutA1 from *E. coli* by protein engineering"
VIII European Symposium of The Protein Society
2009年6月17日、Zurich
- ⑥ 松浦祥悟、竹平 美千代、George Makhatadze、Bagautdin Bagautdinov、国島 直樹、油谷 克英 :
"大腸菌由来 CutA1 へのイオン性残基導入による熱安定性の変化"
第9回日本蛋白質科学会年会
2009年5月20日、熊本市
- ⑦ 松浦祥悟、太田元規、竹平美千代、Bagautdin Bagautdinov、国島直樹、油谷克英 :
"大腸菌 CutA1 の安定性の蛋白質工学; 超好熱菌レベルを目指して":
2009年度 日本農芸化学会
2009年3月28日、福岡市
- ⑧ 松浦祥悟、山本等、太田元規、小笠原京子、竹平美千代、Bagautdin Bagautdinov、国島直樹、相宏宇、加藤悦子、油谷克英:
"大腸菌 CutA1 蛋白質の熱安定性を超好熱菌レベル(変性温度 150°C)に近づける試み"
第8回日本蛋白質科学会年会.
2008年6月11日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 祥悟 (MATSUURA YOSHINORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・リサーチアソシエイト

50513462