

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500366

研究課題名(和文) 熱安定性計算による超好熱菌蛋白質の変性状態構造と耐熱化機構の解明

研究課題名(英文) A free energy calculation study on the thermal stability and denatured state structure of RNaseHII

研究代表者

斎藤 稔 (Minoru, Saito)

弘前大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60196011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の変性状態の構造は全くわかっていない。なぜなら、変性状態の蛋白質を実験で研究することが困難だからである。本研究の目的は、超好熱菌の蛋白質RNaseHIIの変性状態の構造を、アミノ酸置換による熱安定性変化を通して予測することである。筆者らは、MDシミュレーションを基にした自由エネルギー摂動計算によって、変異体の熱安定性自由エネルギー変化を求めた。変性状態の特別なモデル構造のみ、熱安定性自由エネルギーの計算値が実験値と一致した。これは、仮定した変性状態の構造が正しいことを意味している。その結果、RNaseHIIの特定の部位は、変性状態においても立体構造を保持していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The thermal stability of proteins is determined by the delicate balance between the free energy of the native state and that of the denatured state. Structures of the native state have been obtained at high resolutions for many proteins. However, structures of the denatured state have not yet been obtained for any proteins in spite of their importance in clarifying the stability mechanisms of proteins. In this study, we obtained reliable model structures of RNaseHII in the denatured state from high temperature MD simulations. The model structures successfully gave almost the same stability free energy as experimental values for all Ile and Leu mutants. The stability free energies of the mutants were calculated by the free energy perturbation method based on MD simulations. The software used in this study, COSMOS90 for MD simulations, PERTURB for amino-acid substitutions, and FENE for free energy estimations, were developed by the author.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：熱安定性蛋白質 自由エネルギー計算 アミノ酸置換 超好熱菌 分子動力学シミュレーション 変性状態 天然状態 変異

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の立体構造は、次々に明らかにされてきたが、それはすべて天然状態の構造である。蛋白質が変性状態で、どのような構造をとっているかは、いまだにわかっていない。

蛋白質の変性状態については、これまで、あまり注目されてこなかった。しかし、蛋白質の熱安定性を考えるためには、必要不可欠である。なぜなら、蛋白質が熱的に安定かどうかは、天然状態と変性状態との自由エネルギー差で決まっているからである。天然状態の自由エネルギーに比べて、変性状態の自由エネルギーが大きければ、蛋白質は変性しにくく（壊れにくく）熱的に安定になる。

例えば、蛋白質は、野生型と変異型（蛋白質を構成するアミノ酸の一部が変わっている変異体蛋白質）とでは、熱安定性が一般に異なる。なぜなら、アミノ酸が別なアミノ酸に変わることによって、天然状態と変性状態の自由エネルギーが変化して、それらの間の自由エネルギー差も一般に変わるためである。

蛋白質の熱安定性の実験は、天然状態から変性状態への変性温度やそれらの間の自由エネルギー差を測定して研究されてきた。更に、それらの研究結果とともに、天然状態の立体構造を詳細に分析し、表面積や内部の空隙などの特長を抽出して議論してきた。

しかし、もう片方の変性状態の構造や特長について研究されたことはこれまでなかった。なぜなら、変性状態は、しっかりした構造をとらないため、従来の構造解析の手段（X線結晶構造解析）の方法が使えないからである。

一方、コンピュータシミュレーションで蛋白質の熱安定性を研究する方法がある。蛋白質の野生型と変異型の熱安定性自由エネルギーの違いが、天然状態と変性状態のアミノ酸置換による自由エネルギー変化に等しいことを利用した方法である。すなわち、アミノ酸置換による天然状態と変性状態の自由エネルギー変化を計算で求め、その差から熱安定性自由エネルギー変化を計算するのである（図1）。

コンピュータシミュレーションでは、アミノ酸を構成する個々の原子の力場パラメータを変更することによって、別のアミノ酸に変形させることが可能である。この手続きを、シミュレーションをしながら徐々に行うことによって、その際の自由エネルギー変化を見積もることが可能である。

筆者は、このような方法で、4種類の蛋白質の16個の変異体について、熱安定性変化を計算した。その結果、計算値は実験値と良く一致した。この計算には、計算値を実験値に近づけるようなフィッティングパラメータや任意パラメータは使われていない。したがって、計算で予測したことと同等である（図2）。

ただし、変性状態の構造がわかっていないため、筆者の計算方法では完全に壊れて伸び

きった蛋白質を仮定している。すなわち、置換対象のアミノ酸の前後2残基の長さのペプチドを変性状態のモデル構造として用いている。前後2残基以遠のアミノ酸からの相互作用（特に長距離クーロン力）は、それを取り囲む水分子によってシールドされるはずなので、省略している。

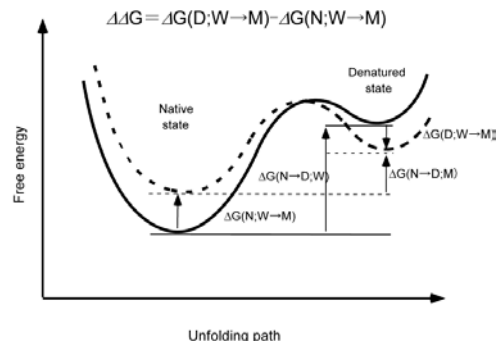


図1. 自由エネルギープロファイル

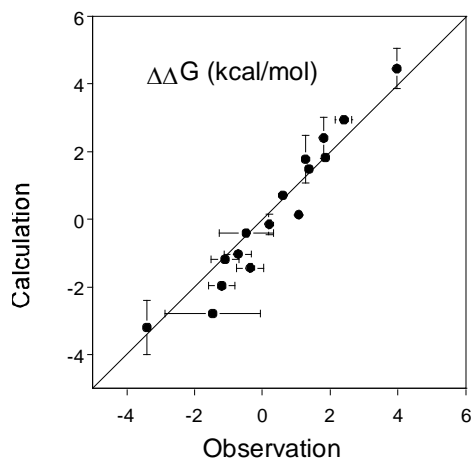


図2. 熱安定性自由エネルギーの計算値と実験値との比較

その後、筆者が計算した蛋白質の熱安定性は、すべて変性剤を使って天然状態を変性させて測定していたことがわかった。言い換えれば、変性剤によって、蛋白質の変性状態の構造は完全に壊れていると期待される。すなわち、筆者が用いた変性状態のモデル（置換対象のアミノ酸の前後2残基の長さのペプチド）は、実際にそくしたモデルだったのである。

一方、変性剤を使わずに高温にして、蛋白質を変性させ、熱安定性を調べる実験に注目した。これらの蛋白質の変性状態では、構造が完全に壊れていないかもしれない。そして、筆者の変性状態の仮定は成り立たないかもしれない。そこで、これらの蛋白質の変異体の熱安定性の計算を、あえて上記と同様の仮定のもとに行った。その結果、やはり計算値

は、実験値と一致しなかった。

高温で自然に変性した蛋白質は、どのような構造をしているのだろうか。変性状態の構造を仮定せずに、明らかにする必要がある。そうすれば、熱変性の際の蛋白質の熱安定性もまた、自ずと計算値と実験値が一致するに違いない。

逆に、計算値と実験値とが一致するような変性状態のモデル構造を選ぶことによって、変性状態の立体構造についての知見を得られるはずである。このような発想から、「熱安定性の計算をとおして、蛋白質の変性状態の構造を明らかにする」という本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的「熱安定性の計算をとおして蛋白質の変性状態の構造を知る」を達成するためには、熱変性による熱安定性の実験が徹底的に行われている蛋白質を選ぶ必要がある。

超好熱菌が持つ蛋白質 RNaseHII に注目した。RNaseHII は、大阪大学の金谷研究室によって、すべての Ile (5 個) と Leu (4 個) が、それぞれ一個ずつ Ala に置換した変異体の熱安定性が測定されていた (図 3)。

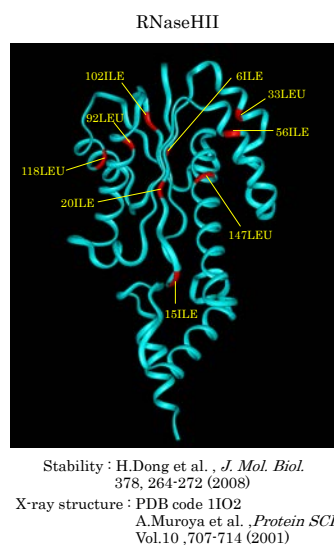


図 3. RNaseHII のアミノ酸置換部位

この RNaseHII は、筆者の研究目的に最適である。なぜなら、(1) 極めて熱的に安定であるため、Ile や Leu を Ala に置換しても、天然状態の構造は保たれている。(2) Ile と Leu は、RNaseHII の立体構造の全体に分布しているため、Ile と Leu の周辺構造から、全体の構造を推測することが可能である。

以上の理由から、超好熱菌 RNaseHII を研究対象に選び、熱安定性計算を行い、変性状態の構造を予測することにした。

3. 研究の方法

以下のような手順で計算を行う。

(1) 超好熱菌 RNaseHII の水中での平衡構造を得るため、X 線結晶構造解析から得られている RNaseHII の構造を水の球に沈め、温度を 300K に設定して長時間のシミュレーションを行う (図 4)。

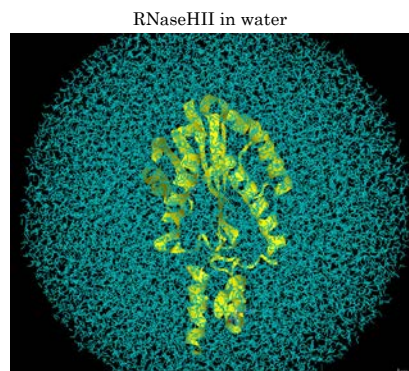


図 4. 水中の RNaseHII

シミュレーションは、筆者が開発したソフトウェア COSMOS90 を用いる。

(2) RNaseHII の変性状態の候補となる多くの構造を得るため、高温 (400K, 500K, 600K, 700K) でのシミュレーションを行う。短時間で高温での構造を効率よくサンプルするため、実験で行うよりも非常に高い温度に設定している。非常に高い温度であるが、計算では化学結合が壊れることは無い。

(3) RNaseHII の 9 個の変異体に対して、天然状態の自由エネルギー変化を計算する。上の (1) で得られた 300K の平衡構造に対して、徐々にアミノ酸を変形させ (アミノ酸置換)、アミノ酸置換に伴う自由エネルギー変化を計算する。ミューテーションは、一つのアミノ酸置換に対して、10 段階に分けて徐々に行う。すなわち、100ps の長さのシミュレーションを 10stage 行う。これらの計算は、筆者が開発したソフトウェア、PERTURB と FENE を用いる。得られた自由エネルギー変化の値が正しいことを確認するために、逆方向のミューテーション Ala から Ile (or Leu) も行う。更に、400ps の長さのシミュレーションを 10stage 行って比較する。手順の違いによって、自由エネルギーの計算値に大きな違いが生じないことを確認する。

(4) 上の (3) と同様の手順で、高温のシミュレーションから得られた変性状態の候補となる構造に対して、自由エネルギー変化を計算する。候補は非常に多いため、計算量は膨大になる。得られた変性状態の自由エネルギー変化の値と上の (3) から得られた天然状態の値とから、熱安定性自由エネルギー値を得る。この計算値と実験値に近い値になる候補を、有力候補とする。有力候補の共通した構造を、アミノ酸置換部位の変性状態における予測構造とする。

4. 研究成果

実施したすべての計算を時間で合計すると 500 ナノ秒であった。RNaseHIII は、中規模の大きさの蛋白質であるが、計算量は大規模になった (表 1)。

表 1. 実施した計算のリストアップ

Nstate		44ns
	Mutation	Forw.+Rev
	5×100ps×10	5ns+5ns
	5×400ps×10	20ns+20ns
	4×100ps×10	4ns+4ns
	4×400ps×10	16ns+16ns
Dstate		
400K		79ns
500K		60ns
600K		14ns
700K		5ns
	Equilibration	
500K	→300K×61	61ns
600K	→300K×15	15ns
Mutant		400K,500K,600K
Ile 6		4ns+8ns
15		5ns+10ns
20		14ns+12ns
56		1ns+15ns+5ns
102		3ns+9ns
Leu 33		6ns+5ns
92		3ns+7ns
118		8ns+7ns
147		3ns+8ns
Total		501ns

天然状態の自由エネルギー変化の計算値は、アミノ酸置換の方向 (Forward, Reverse) や 1 ステージあたりのシミュレーション時間 (100ps, 400ps) の違いに大きく依存すること無く、すべての変異体について高精度で求めることができた。

一方、変性状態の自由エネルギー変化の計算には、多大な労力を要した。その原因は、シミュレーションのどの温度のどの時間に有力なモデル構造が現れるか事前にわからないために、可能な多くの構造に対して自由エネルギー計算を繰り返し実施しなければならなかったからである。

すべての変異体について、変性状態のモデル構造を探索した結果、それぞれの変異体について、熱安定性自由エネルギー値の実験値に近い計算値を与えるモデル構造を数個ずつ抽出することに成功した (表 2、Leu33 と 92 については、現在行っている)。

表 2. 抽出したモデル構造の数

Mutants		500K	600K
Ile	6	3	2
	15	6	-
	20	-	2
	56	1	2
	102	-	3
Leu	33	-	-
	92	-	-
	118	2	2
	147	-	5

これらの有力な変性状態のモデル構造には共通の特長が見られた。そして、それらの共通の特長は、Ile (or Leu) の部位によって顕著に異なっていた。すなわち、水への露出度や周辺残基との位置関係などは、部位による違いが見られた。

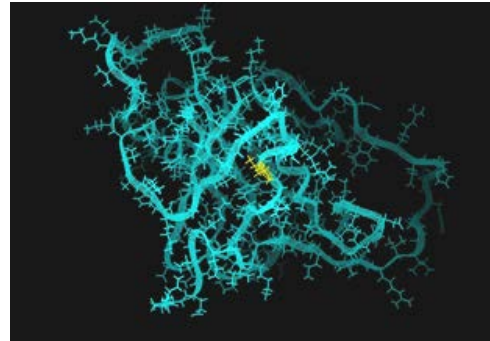


図 5. RNaseHIII の変性状態のモデル構造の一つ

Ile (or Leu) の部位によっては、変性状態のモデルとして、天然状態の構造に近い構造を持つものがあつた (図 5)。すなわち、このような部位は、変性状態において、構造が完全には壊れていないで天然状態の構造を保っていると考えられる。これは、研究を開始する時点で期待していた結果である。

以上の研究結果は、変性状態の構造を具体的に予測した最初の研究である。今のところ、国内外で類似の研究は行われていない。本研究の結果をとりまとめて、国際的な学術雑誌に投稿する予定である。更に、本研究の結果を、実験によって検証する方法を実験家に提案したいと考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

佐藤 文明、斎藤 稔、石原 進、渡辺 尚、
共立出版、シミュレーション、2014、
243(125-196)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 稔 (SAITO, Minoru)

弘前大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：60196011

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：