

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16151

研究課題名(和文)ハロゲン原子の導入によるタンパク質の構造安定化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of structural stability of halogenated protein

研究代表者

山岸 賢司(YAMAGISHI, Kenji)

日本大学・工学部・講師

研究者番号：90460021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、わずか数個のハロゲン原子導入が引き起こすタンパク質の構造安定化の分子メカニズムを、タンパク質の分子内相互作用の観点で、計算化学的に明らかとした。ハロゲン原子が導入され、タンパク質全体の構造安定性が増大したグルタチオン-S-転移酵素(GST)に対して、フラグメント分子軌道(FMO)計算を行い、GSTを構成するすべてのアミノ酸残基ペアの相互作用エネルギーを算出した。実験的にはアプローチが難しいタンパク質の分子内相互作用を、計算化学手法により解析し、ハロゲン原子導入によるタンパク質の構造安定化メカニズムを明らかとすることができた。

研究成果の概要(英文)：We have performed the ab initio fragment molecular orbital (FMO) calculations for wild-type and halogenated glutathione S-transferase (GST). In order to understand the mechanism of structural stability of the halogenated protein, we calculated the interaction energies for all residue pairs in GST by using pair interaction energy analysis based on the FMO method. The FMO-MP2 method can be used to correctly evaluate both the electrostatic and van der Waals dispersion interactions, and it affords these interaction energies separately. Differences in interaction energies of each residue pair between the two structures were interpreted as the effect of halogenation. The results show that halogen moieties formed stabilizing interaction with the neighboring residues.

研究分野：計算化学

キーワード：人工アミノ酸 相互作用解析 フラグメント分子軌道法 相互作用エネルギー 構造安定化 ハロゲン原子 軌道間相

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生体適合性や生分解性を合わせ持つ環境にやさしい、新しい生体ナノ材料として医療や食品、化学産業など様々な分野への応用が進んでいる。医薬品では、すでにタンパク質を中心としたバイオ医薬品へと開発の中心が移動している。また、環境分野では、プラスチックなどを分解する酵素や、バイオエタノールの生産など、地球環境問題の解決にタンパク質の持つ機能の利用が欠かせない。しかし、タンパク質の構造は温度や pH など外的な環境変化に対して弱く、タンパク質の持つ機能を人工的に利用する場合、その構造安定性を向上させることが重要な課題である。

アミノ酸を組み替える従来の構造安定化手法は、構造の変化が大きいため、タンパク質全体の構造や機能を変えてしまう危険性があった。申請者は、タンパク質を構成している特定のチロシンにハロゲン原子をただ一つ導入したハロゲン化チロシンに置き換えるだけで、タンパク質の構造安定性が大幅に向上することを見出した (理研: プレスリリース 2015 年 5 月 26 日 [1])。

これまでに、グルタチオン-S-転移酵素 (Glutathione-S-Transferase: GST) をはじめとする複数のタンパク質で、ハロゲン化により構造の安定化が確かめられた。この方法を利用すれば、タンパク質本来の構造や機能に与える影響を最小限に抑えつつ、タンパク質の構造安定性を容易に向上させることができる。しかし、わずか数個のハロゲン原子導入がなぜ、タンパク質全体の構造を安定化させるのか? その分子メカニズムは明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、わずか数個のハロゲン原子の導入が引き起こすタンパク質の構造安定化の分子メカニズムを、タンパク質の分子内相互作用の観点で、計算化学的に明らかにする。そして構造安定化において、ハロゲン原子の導入が簡便で汎用性が高いことを示す。これによりタンパク質を分子素材として、様々な分野へ応用する技術基盤の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、「グルタチオン-S-転移酵素 (GST)」を解析の対象とした。この酵素のチロシン 7 個をハロゲン化チロシンに置き換えたところ、酵素の構造安定性が大幅に向上した。ハロゲン原子が導入された GST の構造全体に対して、フラグメント分子軌道 (FMO) 計算により電子状態を解析する。そして、GST の分子内相互作用を網羅的に解析し、ハロゲン原子導入が引き起こすタンパク質の構造安定化の分子メカニズムを明らかとしていく。

FMO 計算では、GST は、1 アミノ酸残基単

位でフラグメントに分割した。ハロゲン化したチロシン、および 23 番目のロイシンは、さらに主鎖と側鎖に分割した。計算レベルは MP2/6-31G\*\* とし、ハロゲン原子のみ 6-311G\*\* を用いた。解析の対象とした野生型 GST (WT-GST)、およびハロゲン化 GST (X-GST) の立体構造は、X 線の結晶構造を基に作成した。また、ハロゲン化 GST から、ハロゲン原子を水素原子に置き換えただけの GST (H-GST) の立体構造も作成した。結晶構造で欠損していた水素原子は分子モデリングソフト SYBYL を用いて付加し、全ての水素原子に対して Tripos 力場を用いた分子力学法でエネルギー極小化計算を行った。FMO 計算は、プログラムに PAICS [2] を用いた。

### 引用文献

- [1] Kazumasa Ohtake, Kenji Yamagishi, Kensaku Sakamoto et al., Scientific Reports. 5, 9762, (2015).
- [2] Takeshi Ishikawa et al., J. Comput. Chem., 30, 2594, (2009).

### 4. 研究成果

ハロゲン原子が導入され、その構造安定性が大幅に向上したハロゲン化 GST、ハロゲン化していない野生型の GST (WT-GST)、およびハロゲン化 GST のハロゲン原子を水素原子に置換することで作成した野生型 GST (H-GST) に対して、第一原理に基づく電子状態計算手法であるフラグメント分子軌道 (FMO) 計算を実行し、その電子状態を決定した。

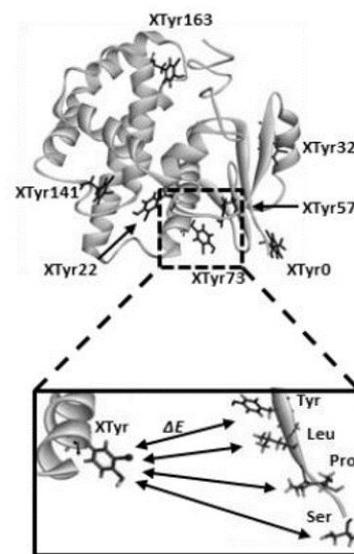


図 1. ハロゲン化 GST の立体構造とハロゲン原子の局所的相互作用

次に、この FMO 計算によって決定した電子状態に基づき、GST を構成するすべてのアミノ酸ペアの相互作用エネルギーを解析した。この相互作用エネルギーは、HF エネルギーと電子相関エネルギーに分けて解析を

進めた。WT-GST とハロゲン化 GST で同じアミノ酸残基ペアの相互作用エネルギーを比較し、その差をハロゲン原子の効果とした。

はじめに、ハロゲン原子が導入されたアミノ酸ごとに、ハロゲン原子の効果を解析した。図2は、ハロゲン化した7つのチロシンのうち、ハロゲン原子導入による効果が最も大きかった32番目のチロシン(Tyr32)の解析結果である。グラフは、ハロゲン化したチロシンとその周囲のアミノ酸との相互作用エネルギーを、Eはハロゲン原子の効果を示した。その結果、ハロゲン化したTyr32は、Lys43(K43)と強い安定化相互作用を形成していた。Lys43との相互作用は、Tyr32をハロゲン化することでより強くなっている。また、Lys39(K39)との相互作用もまた、ハロゲン化の効果が大いアミノ酸であり、Tyr32のハロゲン化により、その相互作用は大きく安定化した。

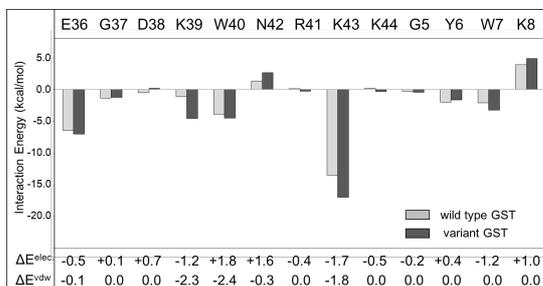


図2. ハロゲン化したチロシン32とアミノ酸との相互作用エネルギー

Tyr32 に対するハロゲン原子の導入は、タンパク質の構造安定性を高める効果が特に高いことが実験的にも報告されている。図3には、Tyr32とLys39およびLys43との位置関係を示した。Lys39およびLys43はヘリックスの両端に存在する。このことから、Tyr32をハロゲン化することで、Lys39とLys43との相互作用が強まり、ヘリックスを固定する。これにより、タンパク質の2次構造間の安定性が強まり、タンパク質全体の構造が安定化したものと示唆される。

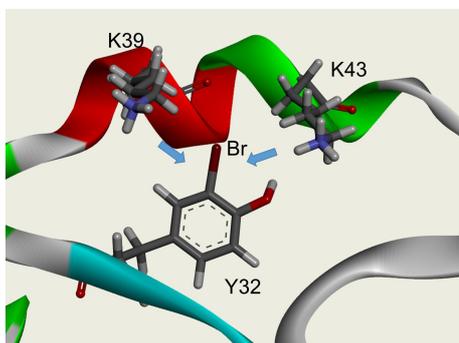


図3. Tyr32周辺の立体構造

Tyr73は、ハロゲン原子導入による効果が、Tyr32について大きいアミノ酸であった。Tyr73は、Asp59(D59)とLys77(K77)との相互

作用エネルギーが大きく安定化した。また、ハロゲン原子の効果も Asp59は大きいことが分かった。

Tyr57はハロゲン化することで、Leu4(L4)とAsp59(D59)との相互作用エネルギーが安定化した。Tyr141はハロゲン化することで、Arg181(R181)との相互作用エネルギーが安定化した。このことから、これら2つのチロシンはハロゲン原子導入による耐熱化への寄与は十分あることが示唆された。一方で、Tyr0, Tyr22, および Tyr163は、いずれもハロゲン化による相互作用エネルギーの変化はなかった。したがって、これらの3つのチロシンはハロゲン原子導入による構造安定化への寄与は小さいと考えられる。

ハロゲン原子が導入されたアミノ酸に注目して解析を進めたところ、ハロゲン原子を介してアミノ酸同士の新しい相互作用が生じていることがわかった。

次に、ハロゲン原子の種類の違いによる安定化効果を解析するため、WT-GSTとハロゲン化GSTで同じ残基ペアの相互作用エネルギーを比較し、その差を積算した(図4)。この値は、野生型に比べ、ハロゲン化したタンパク質がどれだけ安定化するかを表す指標になると考える。

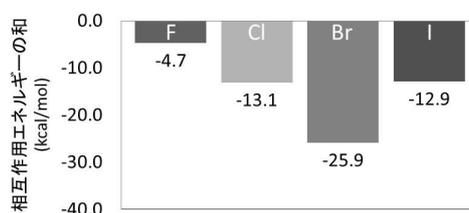


図4. ハロゲン原子種の違いによる構造安定化効果

図4より、いずれのハロゲン原子を導入しても、タンパク質全体に安定化が見られたが、その中でも臭素原子が特に高い安定化への効果を示した。このことから、臭素原子の導入は、タンパク質の構造安定化に対して大きく寄与すると考えられる。一方で、フッ素を導入したGSTは、安定化の傾向が小さく、構造安定化への寄与も小さいことが示唆された。この傾向は、ウェット実験によるタンパク質構造安定性の実験結果の傾向と同じであった。

以上の本研究により、ハロゲン原子導入によるタンパク質の構造安定化のメカニズムは、ハロゲン原子の導入によりタンパク質内の相互作用ネットワークが強化され、タンパク質の立体構造が安定に保たれることが原因であることが明らかとなった。タンパク質の構造安定化メカニズムをアミノ酸残基間の相互作用エネルギーの観点から分子レベルで解明することに成功した。

また、以上の本研究を通じて、非天然アミノ酸に対するFMO計算-解析プロセスの構築ができた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4件)

Kana Koizumi, Yusuke Maeda, Toshifumi Kano, Hisae Yoshida, Taiichi Sakamoto, Kenji Yamagishi, Yoshihito Ueno, Synthesis of 4'-C-aminoalkyl-2'-O-methyl modified RNA and their biological properties, *Bioorg. Med. Chem.*, (2018). 査読有

DOI: 10.1016/j.bmc.2018.05.025

Yasuhiro Gon, Shuichi Maruoka, Toshio Inoue, Kazumichi Kuroda, Kenji Yamagishi, Yutaka Kozu, Sotaro Shikano, Kaori Soda, Jan Lötvall, Shu Hashimoto, Selective release of miRNAs via extracellular vesicles is associated with house dust mite allergen-induced airway inflammation, *Clin Exp Allergy*, 65, 53-55 (2017). 査読有

DOI: 10.1111/cea.13016

Yasuhiro Gon, Shuichiro Maruoka, Toshio Inoue, Kenji Mizumura, Kazumichi Kuroda, Yoshihito Fukano, Kenji Yamagishi, Eriko Tsuboi, Shu Maruoka, Gene expression analysis in airway-secreting extracellular vesicles upon house dust mite exposure, *Allergol. Int.*, 65, 53-55 (2016). 査読有

DOI: 10.1016/j.alit.2016.04.003

Yasui Numata, Maria Otsuka, Kenji Yamagishi, Hiroyuki Tanaka, Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic Acid, Glutamic Acid, Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy, *Analytical Letters*, 50(4), 651-662 (2016). 査読有

DOI: 10.1080/00032719.2016.1193189

### 〔学会発表〕(計 19件)

増川恵介, 関口真裕, 山岸賢司, RNA アプタマーと AML1 タンパク質の結合メカニズムに対する分子シミュレーション解析, 日本化学会第 98 春季年会 2018 年 3 月 20-23 日, 日本大学理工学部 (千葉県・船橋市)

山崎翔, 関口真裕, 山岸賢司, 分子動力学計算による修飾核酸オリゴマーの立体構造解析, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月 20-23 日, 日本大学理工学部 (千葉県・船橋市)

吉田尚恵, 山岸賢司, 都築誠二, RNA アプタマーと標的タンパク質の分子間相互作用解析, SAT テクノロジー・ショーケース 2018, 2018 年 2 月 8 日, つくば国際会議場 (茨城県・つくば市)

関口真裕, 山岸賢司, 分子動力学シミュレーションによる修飾核酸の動的構造解析, 第 60 回日本大学工学部学術研究報告会, 2017 年 12 月 9 日, 日本大学工学部 (福島県・郡山市)

山岸賢司, 生体分子シミュレーション, 第 60 回日本大学工学部学術研究報告会, 2017 年 12 月 9 日, 日本大学工学部 (福島県・郡山市)

Hisae Yoshida, Masahiro Sekiguchi, Keisuke Masukawa, Sho Yamazaki, Emire Inomata, Kazumasa Akita, Takeshi Ishikawa, Taiichi Sakamoto, Kenji Yamagishi, Structure and Dynamics of RNA Aptamer to Human Immunoglobulin G, Chem - Bio Informatics Society (CBI) Annual Meeting 2017, 2017 年 10 月 3-5 日, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

山岸賢司 [依頼講演], 生体分子系に対する分子シミュレーション解析, 化学系学協会東北大会, 2017 年 9 月 16-17 日, 岩手大学 (岩手県・盛岡市)

Hisae YOSHIDA, Masahiro SEKIGUCHI, Kazumasa AKITA, Emire INOMATA, Takeshi ISHIKAWA, Taiichi SAKAMOTO, Kenji YAMAGISHI, Theoretical study on the structure and dynamics of RNA aptamer to human immunoglobulin G, 化学系学協会東北大会, 2017 年 9 月 16-17 日, 岩手大学 (岩手県・盛岡市)

Hisae Yoshida, Masahiro Sekiguchi, Kazumasa Akita, Emire Inomata, Takeshi Ishikawa, Taiichi Sakamoto, Kenji Yamagishi, IN SILICO DESIGN OF RNA APTAMER TO HUMAN IMMUNOGLOBULIN G, 7th edition of the EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, 2017.8.27-31, Vienna University, (Austria, Vienna)

吉田尚恵, 関口真裕, 秋田一雅, 猪股恵美礼, 野村祐介, 石川岳志, 坂本泰一, 山岸賢司, 分子シミュレーションを用いた RNA アプタマーの設計手法の開発, 2017 年 6 月 20-22 日, 第 17 回日本蛋白質科学会年会 (宮城県・仙台市)

関口真裕, 吉田尚恵, 石川岳志, 山岸賢司, 分子動力学計算を用いた修飾 RNA アプタマーの立体構造解析, 第 59 回日本大学工学部学術研究報告会 2016 年 12 月 3 日, 日本大学工学部 (福島県・郡山市)

関口真裕, 小野間優希, 吉田尚恵, 秋田一雅, 猪股恵美礼, 石川岳志, 坂本泰一, 山岸賢司, 分子動力学計算を用いた修飾 RNA アプタマーの構造解析, 日本核酸医薬学会第 2 回年会, 2016 年 11 月 15-17 日, 東京理科大学葛飾キャンパス (東京都・葛飾区)

山岸賢司 [依頼講演], 生体分子シミュレーションによるアプタマーの最適化, CBI (情報計算化学生物) 学会 2016 年大会, 2016 年 10 月 25-27 日, タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

Hisae Yoshida, Toshiki Fukaya, Masahiro Sekiguchi, Emire Inomata, Kazumasa Akita, Takeshi Ishikawa, Taiichi

Sakamoto, Kenji Yamagishi, Molecular Simulation Analysis of RNA Aptamer to Human Immunoglobulin G, Chem-Bio Informatics Society(CBI) Annual Meeting 2016, 2016年10月25-27日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

八巻雷士, 山岸賢司, AR技術を用いた分子構造表示システムの開発と薬学教育への応用, 第55回日本薬学会東北支部大会, 2016年9月25日, 奥羽大学(福島県・郡山市)

関口真裕, 小野間優希, 深谷和紀, 八巻雷士, 吉田尚恵, 石川岳志, 秋田一雅, 猪股恵美礼, 坂本泰一, 山岸賢司, 修飾RNAアプタマーに対する構造活性相関, 第55回日本薬学会東北支部大会, 2016年9月25日, 奥羽大学(福島県・郡山市)

関口真裕, 吉田尚恵, 石川岳志, 宮川伸, 坂本泰一, 山岸賢司, 修飾RNAアプタマーに対するコンフォメーション解析, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年6月7-9日, 福岡国際会議場(福岡県・博多市)

吉田尚恵, 春木満, 山岸賢司, ビタミンD受容体のリガンド認識メカニズムの解明, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年6月7-9日, 福岡国際会議場(福岡県・博多市)

吉田尚恵, 石川岳志, 小橋創介, 鷹嘴潤平, 春木満, 坂本健作, 山岸賢司, ハロゲン原子の導入によるタンパク質の構造安定化メカニズムの解明, 修飾RNAアプタマーに対する構造活性相関, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2016年6月7-9日, 福岡国際会議場(福岡県・博多市)

〔図書〕(計 1件)

山岸賢司, 坂本泰一, In-silicoを用いたタンパク質アプタマーの相互作用解析と分子設計, 「in silico創薬におけるスクリーニングの高速化・高精度化技術」, 技術情報協会, 2018年.  
ISBN 978-4-86104-688-9

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 核酸アプタマー、固相担体、ヒト IgG 精製用カラム、及びヒト IgG の精製方法  
発明者: 山岸賢司, 関口真裕, 吉田尚恵, 坂本泰一, 野村祐介, 石川岳志  
権利者: 日本大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2017-23175  
出願年月日: 2017年2月  
国内外の別: 国内

取得状況(計 1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  
山岸賢司 (YAMAGISHI, Kenji)  
日本大学・工学部・講師  
研究者番号: 90460021

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし