

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21618

研究課題名(和文) 荷電性残基の揺らぎを考慮することで達成される変性温度150 の蛋白質の創製

研究課題名(英文) Thermostable protein with denaturation temperature (Td) of 150 oC will be produced by substitution of ionic residues considering of flexibility in the water

研究代表者

松浦 祥悟 (Yoshinori, Matsuura)

国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：50513462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、150 の変性温度(Td)を持つ超好熱菌由来CutA1に匹敵する熱安定性を持つ蛋白質を変異導入により創製することである。大腸菌由来CutA1の疎水性変異型(Td =113.2 )を鋳型として荷電性残基を導入した結果、最も安定性が増加した変異型のTdは142.2 であった。  
また、分子動力学(MD: Molecular Dynamics)シミュレーションで得られた瞬間構造を用いて評価した結果、各変異型のTdは静電相互作用エネルギーと比例して増加してい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

蛋白質は生体を構成する最も重要な成分の一つであるため、熱安定性向上を意図した蛋白質改変は、基礎研究・応用研究両方にとって有用である。本研究では、大腸菌由来CutA1蛋白質に、荷電性残基を変異導入することによって変性温度150 の超安定蛋白質を再現しようと試みた。その際、水溶液中における荷電性残基の挙動を検証するために、分子動力学(MD:Molecular Dynamics)シミュレーションを用いた。その結果、蛋白質の熱安定性における水溶液中での荷電性残基間の静電相互作用の重要性が示唆され、150 に迫る変性温度を持つ蛋白質を再現することが出来た。

研究成果の概要(英文)： The goal was to see if one can achieve the same stability as for a CutA1 from hyperthermophile Pyrococcus horikoshii that has the denaturation temperature (Td) near 150 oC. The hydrophobic mutant of EcCutA1 (Ec0VV) with Td of 113.2 oC was used as a template for mutations. The highest stability of multiple mutants was a mutant substituted by 9 charged residues that had Td of 142.2 oC. To evaluate the energy of ion-ion interactions of mutant proteins, we used the structural ensemble obtained by molecular dynamics (MD) simulation at 300K. The Td of ionic mutants linearly increases with the increments of the computed energy of ion-ion interactions for ionic mutant proteins even up to the temperatures near 140 oC, suggesting that ion-ion interactions cumulatively contribute to the stabilization of a protein at high temperatures.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：蛋白質工学 蛋白質の熱安定性 静電的相互作用 バイオテクノロジー 超好熱菌 DSC

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生体を構成する最も重要な成分の一つであるため、熱安定性向上を意図した蛋白質改変の試みは古くから行われてきた。しかし、様々な方針が提案されてきたものの、設計指針通りには成功していないのが現状である。我々は、変性温度 ( $T_d$ ) 約 150°C という異常に高い熱安定性を示す超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 CutA1 (*PhCutA1*) 蛋白質を用いて、荷電性残基が熱安定化に果たす役割を明らかにした (*FEBS J.* 2012)。さらに、従来推定の域を出なかった 100°C 以上の温度領域における疎水性相互作用と静電相互作用による熱安定性への寄与を熱力学的に解析した (*Sci. Rep.* 2015)。これらの結果より、特に 100°C を超える高温領域では、蛋白質の熱安定化にとって静電相互作用が重要であることが示唆された。

CutA1 は大腸菌で最初に同定されており、様々な生物種に保存されていることが分かっている。CutA1 の機能は未だよく分かっていないが、種々の生物種に由来する 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 共通の立体構造が、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。

現状として、分子内部への疎水性残基導入による耐熱化の場合と比較すると、荷電性残基導入による耐熱化は予測精度が低い。それは、イオン結合導入による蛋白質の耐熱化に際しては、揺らぎの大きい分子表面が置換対象となる場合が多いためであると考えられる。安定化予測を行う際には結晶構造を用いることが多いが、結晶構造は準安定状態の静止した構造であるため、水中におけるアミノ酸残基同士の相互作用が実際と著しく異なる場合がある。本課題では、分子動力学(MD: Molecular Dynamics)シミュレーションを用いることでこの問題の解決を目指した。

## 2. 研究の目的

本課題では、主に荷電性残基を導入することによって、常温生物である大腸菌由来 CutA1 (*EcCutA1*;  $T_d=90^\circ\text{C}$ ) の熱安定性を超好熱菌の熱安定性 (*PhCutA1*;  $T_d=150^\circ\text{C}$ ) にまで増加させることで、静電相互作用強化による蛋白質の耐熱化を立証する。その際、分子動力学(MD)シミュレーションによる蛋白質内の荷電性残基の揺らぎ情報を用いることによって、荷電性残基導入による普遍的な蛋白質の熱安定化設計指針の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本課題では、これまでの研究で得られた野生型と比較して  $T_d$  が約 26°C 上昇し、熱可逆性が良好に改善された *EcCutA1* 変異型 (*Ec0VV*: *EcCutA1* C16A/C39A/C79A/S11V/E61V  $T_d=115^\circ\text{C}$ ) を鋳型蛋白質として用い、荷電性残基導入により *PhCutA1* ( $T_d=150^\circ\text{C}$ ) の  $T_d$  まで増加させる。

まず初めに、荷電性残基を一残基変異導入した変異型を網羅的に作製し、熱安定性の変化を DSC (Differential Scanning Calorimeter: 示差走査熱量計)にて測定することで評価した。熱可逆性を示した変異型に関しては、変性に伴う  $\Delta H$  が半分となる温度を  $T_d$  とし、熱可逆性を示さなかった変異型に関しては、変性曲線の頂点温度を  $T_d$  とした。一残基変異型は、FoldX, SPMP などの安定化予測プログラムや、二次構造のヘリックス双極子モーメント、超好熱菌由来 CutA1 蛋白質とのアミノ酸比較など様々な方法によって選出した。また、複数の変異を組み合わせた多重変異型を作製し、熱安定性を同様に評価した。

鋳型となる *Ec0VV* 変異型の構造は、既に立体構造が解かれている *Ec0SH* (*EcCutA1* C16A/C39A/C79A) 変異型の構造データ (PDB ID: 4Y65) を用い、欠損している N 末端領域と S11V/E61V 変異をモデリングすることで取得した。次に、鋳型である *Ec0VV* 変異型と安定性が増加した荷電性残基変異型に関して、モデリングした構造を用いて MD シミュレーションを行った。MD シミュレーションは、インターネット上で公開されている GROMACS を使用し、300K, 40 nano-sec 行った。得られた MD データに関して、FoldX によって静電相互作用の増減を評価し、蛋白質の熱安定性変化との関連性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 荷電性残基導入変異型の熱安定性変化

熱安定化を期待して作製した一残基変異型 83 種類の安定性を評価した結果、安定性が増加した変異型 ( $\Delta T_d > +0.5^\circ\text{C}$ ) は 37、安定性が低下した変異型 ( $\Delta T_d < -0.5^\circ\text{C}$ ) は 31、安定性に変化が生じなかった変異型 ( $-0.5^\circ\text{C} < \Delta T_d < +0.5^\circ\text{C}$ ) は 15 種類得られた (Table 1A)。

変異導入によって安定化した変異型の多くは、正荷電残基変異型であった。これは *Ec0VV* の等電点 (pI) が 4.98 であり、もともと酸性残基の比率が高い蛋白質であったことに起因している。

さらに安定性を増加させるために、*Ec0VV* に多重変異を導入した (Table 1B)。 *Ec0VV* Q87K/T88R で  $T_d$  が +9.2°C、*Ec0VV* H72K/Q87K/T88R 変異型で +14.3°C、*Ec0VV* H72K/S82K/Q87K/T88R 変異型で +18.3°C 程度増加した。さらに、*Ec0VV* A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R (*Ec0VV\_6*) 変異型では  $T_d=136.8^\circ\text{C}$  (+23.6°C) であった。また、*Ec0VV6* にさらに 3 つの変異を導入した *Ec0VV\_9* (*Ec0VV\_Q25R/A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R/T101E/N108E*) の  $T_d$  は 142.2°C であった。これは、*Ec0VV* と比較して  $T_d$  が 29.0°C 増加、野生型と比較して 52.3°C 増加したことになる。

Table 1 *Ec0VV* 荷電性残基変異型蛋白質の変性温度

(A) 一残基変異型

Mutants	$T_d$ (°C)	$\Delta T_d$ (°C)	Mutants	$T_d$ (°C)	$\Delta T_d$ (°C)	Mutants	$T_d$ (°C)	$\Delta T_d$ (°C)
<i>Ec0VV</i> H72K	116.4 ± 0.4	5.2	<i>Ec0VV</i> A109R	114.2 ± 0.1	1.0	<i>Ec0VV</i> A33E	112.3 ± 0.2	-0.9
<i>Ec0VV</i> E57R	118.1 ± 0.3	4.9	<i>Ec0VV</i> D26K	114.2 ± 0.1	1.0	<i>Ec0VV</i> A29E	112.3 ± 0.1	-0.9
<i>Ec0VV</i> H72R	118.0 ± 0.2	4.8	<i>Ec0VV</i> Q25R	114.2 ± 0.1	1.0	<i>Ec0VV</i> Q74E	112.2 ± 0.2	-1.0
<i>Ec0VV</i> E57K	117.6 ± 0.0	4.4	<i>Ec0VV</i> S110K	114.2 ± 0.2	1.0	<i>Ec0VV</i> S48K	112.2 ± 0.9	-1.0
<i>Ec0VV</i> T88R	117.6 ± 0.6	4.4	<i>Ec0VV</i> A33R	114.1 ± 0.2	0.9	<i>Ec0VV</i> S7K	112.1 ± 0.1	-1.1
<i>Ec0VV</i> S110R	117.3 ± 0.4	4.1	<i>Ec0VV</i> Q58K	114.0 ± 0.0	0.8	<i>Ec0VV</i> S48R	112.1 ± 0.1	-1.1
<i>Ec0VV</i> S82R	117.1 ± 0.5	3.9	<i>Ec0VV</i> A33K	114.0 ± 0.2	0.8	<i>Ec0VV</i> Q25E	112.0 ± 0.1	-1.2
<i>Ec0VV</i> Q87R	117.1 ± 0.2	3.9	<i>Ec0VV</i> S105K	113.9 ± 0.1	0.7	<i>Ec0VV</i> S71E	111.8 ± 0.1	-1.4
<i>Ec0VV</i> S82K	116.9 ± 0.5	3.7	<i>Ec0VV</i> A22K	113.9 ± 0.0	0.7	<i>Ec0VV</i> Q58E	111.6 ± 0.1	-1.6
<i>Ec0VV</i> Q87K	116.8 ± 0.5	3.6	<i>Ec0VV</i> A29K	113.7 ± 0.1	0.5	<i>Ec0VV</i> V70E	111.5 ± 0.0	-1.7
<i>Ec0VV</i> T88K	116.1 ± 0.2	2.9	<i>Ec0VV</i> A10R	113.6 ± 0.2	0.4	<i>Ec0VV</i> A75E	110.5 ± 0.3	-2.7
<i>Ec0VV</i> N108K	116.0 ± 0.2	2.8	<i>Ec0VV</i> A29R	113.6 ± 0.1	0.4	<i>Ec0VV</i> V70R	109.5 ± 0.8	-3.7
<i>Ec0VV</i> S71R	116.0 ± 0.1	2.8	<i>Ec0VV</i> T101R	113.5 ± 0.1	0.3	<i>Ec0VV</i> A33D	109.5 ± 0.1	-3.7
<i>Ec0VV</i> E34K	116.0 ± 0.1	2.8	<i>Ec0VV</i> A79K	113.4 ± 0.2	0.2	<i>Ec0VV</i> A79E	109.2 ± 0.2	-4.0
<i>Ec0VV</i> S105R	115.7 ± 0.2	2.5	<i>Ec0VV</i> E53R	113.1 ± 0.1	-0.1	<i>Ec0VV</i> K81R	109.1 ± 0.1	-4.1
<i>Ec0VV</i> S71K	115.7 ± 0.3	2.5	<i>Ec0VV</i> L2E	113.1 ± 0.1	-0.1	<i>Ec0VV</i> Q73E	108.8 ± 0.3	-4.4
<i>Ec0VV</i> E34R	115.7 ± 0.1	2.5	<i>Ec0VV</i> Y60E	113.1 ± 0.0	-0.1	<i>Ec0VV</i> A39K	108.7 ± 0.0	-4.5
<i>Ec0VV</i> H88D	115.6 ± 0.0	2.4	<i>Ec0VV</i> A10E	113.0 ± 0.6	-0.2	<i>Ec0VV</i> Q73K	108.1 ± 0.1	-5.1
<i>Ec0VV</i> N108R	115.5 ± 0.1	2.3	<i>Ec0VV</i> A22R	112.9 ± 0.0	-0.3	<i>Ec0VV</i> T97K	107.7 ± 0.0	-5.5
<i>Ec0VV</i> T47K	115.3 ± 0.2	2.1	<i>Ec0VV</i> T97E	112.9 ± 0.0	-0.3	<i>Ec0VV</i> T68D	107.5 ± 0.2	-5.7
<i>Ec0VV</i> N108E	115.3 ± 0.1	2.1	<i>Ec0VV</i> T69K	112.8 ± 0.0	-0.4	<i>Ec0VV</i> A39R	107.0 ± 0.1	-6.2
<i>Ec0VV</i> A75R	115.3 ± 0.1	2.1	<i>Ec0VV</i> A10K	112.7 ± 0.1	-0.5	<i>Ec0VV</i> G45K	106.3 ± 0.4	-6.9
<i>Ec0VV</i> Q25K	115.2 ± 0.0	2.0	<i>Ec0VV</i> E59K	112.7 ± 0.0	-0.5	<i>Ec0VV</i> S48D	105.4 ± 0.2	-7.8
<i>Ec0VV</i> W52K	115.0 ± 0.2	1.8	<i>Ec0VV</i> Q74R	112.7 ± 0.0	-0.5	<i>Ec0VV</i> A39D	105.4 ± 0.5	-7.8
<i>Ec0VV</i> W52R	114.9 ± 0.3	1.7	<i>Ec0VV</i> L2R	112.5 ± 0.2	-0.7	<i>Ec0VV</i> H72E	102.4 ± 0.0	-10.8
<i>Ec0VV</i> S105E	114.4 ± 0.2	1.2	<i>Ec0VV</i> A109E	112.4 ± 0.2	-0.8	<i>Ec0VV</i> Q63K	102.2 ± 0.5	-11.0
<i>Ec0VV</i> Q58R	114.4 ± 0.4	1.2	<i>Ec0VV</i> S6R	112.3 ± 0.1	-0.9	<i>Ec0VV</i> H72D	96.3 ± 0.2	-16.9
<i>Ec0VV</i> T101E	114.4 ± 0.3	1.2	<i>Ec0VV</i> H83K	112.3 ± 0.1	-0.9			

(B) 多重変異型

Mutants	$T_d$ (°C)	$\Delta T_d$ (°C)
<i>Ec0VV</i> Template	113.2 ± 0.2	0.0
<i>Ec0VV</i> A39D/S48K	118.3 ± 0.7	5.1
<i>Ec0VV</i> Q87K/T88R	122.4 ± 0.6	9.2
<i>Ec0VV</i> Q87K/T88R/S110R	120.8 ± 0.4	7.6
<i>Ec0VV</i> Q87K/T88R/S82K	126.0 ± 0.8	12.8
<i>Ec0VV</i> Q87K/T88R/H72K	127.5 ± 0.5	14.3
<i>Ec0VV</i> Q87K/T88R/H72K/S82K	131.5 ± 0.6	18.3
<i>Ec0VV</i> _6	136.8 ± 0.9	23.6
<i>Ec0VV</i> _6 E34R	133.8 ± 0.0	20.6
<i>Ec0VV</i> _6 S110R	135.3 ± 0.0	22.1
<i>Ec0VV</i> _6 E57R	136.8 ± 0.1	23.6
<i>Ec0VV</i> _6 T101E	139.3 ± 0.3	26.1
<i>Ec0VV</i> _6 Q25R/T101E	140.3 ± 0.1	27.1
<i>Ec0VV</i> _6 Q25R/T101E/N108E ( <i>Ec0VV</i> _9)	142.2 ± 0.2	29.0

(2) MD シミュレーションから予測される荷電性残基間の距離の変化

変異により導入した荷電性残基が水中で他の荷電性残基とどのように相互作用するかを明らかにするために、*EcCutA1* 変異型の MD シミュレーションを 300K で 40nano sec 行った。

Fig. 1 では *Ec0VV*\_6 におけるイオン対の例を示している。*Ec0VV*\_6 のサブユニット A の Asp39 の C $\chi$ 原子と、同じサブユニット A の Lys67 の C $\epsilon$ 原子の距離は 2.2±0.2Å であり、この揺らぎは非常に小さいことが示唆された(Fig. 1a)。サブユニット A の Glu90 とサブユニット B の Lys67 の場合(Fig. 1b)、二つの残基間の強い塩結合間で揺れており、平均距離は 3.5±1.2 Å であった。サブユニット A の Lys5 と Glu4 の間の距離は非常に大きく揺れていて 5.8±1.8 Å であるが、この揺らぎの範囲は大きいながらも一定である(Fig. 1c)。一方、サブユニット間の相互作用である Arg88 (サブユニット B) と Asp39 (サブユニット C) ではひどく不安定であった。これらの揺らぎ情報は荷電性残基間の静電相互作用による熱安定化を理解する上で有用であると考えられる。

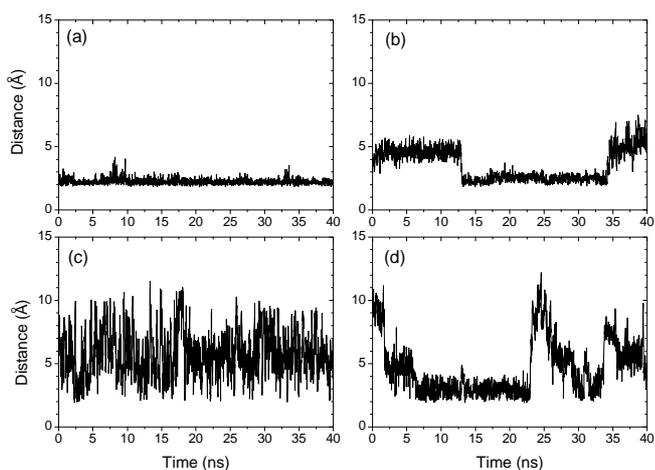


Fig. 1

*Ec0VV*\_6 におけるイオン-イオン相互作用の経時変化の例  
 (a) Asp39(C $\chi$ ) - Lys67(C $\epsilon$ ) 間の距離(サブユニット A)  
 (b) A サブユニット Glu90 (C $\delta$ ) - B サブユニット Lys67(C $\epsilon$ )  
 (c) Glu4(C $\delta$ ) - Lys5(C $\epsilon$ ) (サブユニット A)  
 (d) Arg88(C $\delta$ ) (サブユニット B) - Asp39(C $\chi$ ) (サブユニット C)

(3) 荷電性残基導入による静電相互作用の増減と変性温度の変化の関係

荷電性残基間の静電相互作用を評価するために、各変異型の MD シミュレーション中の 17 構造を選出した(RMSD 値がほぼ一定に達した 8ns から 2ns 毎に経過した各瞬間構造を選出)。これらの瞬間構造を用いて荷電性残基間の静電相互作用エネルギーを FoldX によって評価した。各変異型における蛋白質分子全体での静電相互作用エネルギー (17 構造の平均値) と各変異型の  $\Delta T_d$  の関係を Table 2, Fig. 2 に示した。荷電性残基導入によって熱安定化した多くの変異型では、蛋白質分子全体での静電相互作用が強化されており、静電相互作用と  $\Delta T_d$  の増加とは高い相関を示した ( $r = -0.94$   $p = 2.70 \times 10^{-10}$ )。



(C) Lys72

	mutants								
	Ec0VW_H72K			Ec0VW_6			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy		pairs	energy	
Lys72	N-terminal	inter	0.1	N-terminal	inter	0.3	N-terminal	inter	0.0
	ASP3	inter	-0.2	ASP3	inter	-0.2	ASP3	inter	-0.2
	GLU4	inter	-0.3	GLU4	inter	-0.2	GLU4	inter	-1.0
	LYS5	inter	0.0	LYS5	inter	0.0	LYS5	inter	0.2
	GLU53	inter	-0.7	GLU53	inter	-0.7	GLU53	inter	-0.6
	Inter-sum		-1.0			-0.7			-1.6
	LYS30	intra	0.0	LYS30	intra	0.0	LYS30	intra	0.0
	GLU34	intra	-1.5	GLU34	intra	-1.7	GLU34	intra	-2.0
	LYS35	intra	1.3	LYS35	intra	1.5	LYS35	intra	1.7
	ASP39	intra	0.0	ASP39	intra	0.0	ASP39	intra	0.0
	GLU78	intra	-0.8	GLU78	intra	-0.8	GLU78	intra	-0.7
	HIS83	intra	0.1	LYS82	intra	0.2	LYS82	intra	0.2
				HIS83	intra	0.0	HIS83	intra	0.0
				GLU108	intra	-0.8			
	C-terminal	intra	-12.5	C-terminal	intra	-16.2	C-terminal	intra	-14.5
Intra-sum		-13.4			-16.9			-16.1	
Total sum		-14.3			-17.6			-17.7	

(D) Lys82

	mutants								
	Ec0VW_S82K			Ec0VW_6			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy		pairs	energy	
Lys82	N-terminal	inter	0.4	N-terminal	inter	0.9	N-terminal	inter	0.7
	GLU4	inter	-0.2	ASP3	inter	0.0	ASP3	inter	-0.1
				GLU4	inter	-0.4	GLU4	inter	-0.4
				LYS5	inter	0.0	LYS5	inter	0.0
	HIS98	inter	0.0	HIS98	inter	0.0			
	ASP100	inter	-0.8	ASP100	inter	-0.8	ASP100	inter	-0.8
							GLU101	inter	-0.4
	ASP102	inter	-0.4	ASP102	inter	-0.4	ASP102	inter	-0.4
	Inter-sum		-1.0			-0.4			-1.2
	ASP26	intra	-0.2	ASP26	intra	-0.1	ASP26	intra	-0.1
	LYS30	intra	1.1	LYS30	intra	0.6	LYS30	intra	0.6
	GLU34	intra	-1.8	GLU34	intra	-2.0	GLU34	intra	-1.9
	LYS35	intra	0.0	LYS35	intra	0.0	LYS35	intra	0.0
	HIS72	intra	0.0	LYS72	intra	0.2	LYS72	intra	0.2
	GLU78	intra	-6.8	GLU78	intra	-6.1	GLU78	intra	-8.4
	LYS81	intra	1.0	LYS81	intra	1.2	LYS81	intra	1.1
	HIS83	intra	0.8	HIS83	intra	0.6	HIS83	intra	0.2
	HIS84	intra	0.0	HIS84	intra	0.0			
				LYS87	intra	0.1	LYS87	intra	0.5
				ARG88	intra	0.3	ARG88	intra	0.6
				GLU90	intra	0.0			
	C-terminal	intra	0.0	C-terminal	intra	-0.1	C-terminal	intra	0.0
	Intra-sum		-5.8			-5.2			-7.2
	Total sum		-6.8			-5.6			-8.4

(E) Lys87

	mutants								
	Ec0VW_Q87K			Ec0VW_6			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy		pairs	energy	
Lys87	N-terminal	inter	0.1	N-terminal	inter	0.0	N-terminal	inter	0.1
							ARG25	inter	0.0
	LYS35	inter	0.0	LYS35	inter	0.0			
				ASP39	inter	-0.5	ASP39	inter	-0.4
	LYS67	inter	0.1	LYS67	inter	0.0	LYS67	inter	0.0
	ASP100	inter	-0.7	ASP100	inter	-0.9	ASP100	inter	-0.8
							GLU101	inter	-0.2
	ASP102	inter	-1.4	ASP102	inter	-2.3	ASP102	inter	-1.4
	ARG112	inter	0.0	ARG112	inter	0.0	ARG112	inter	0.0
	Inter-sum		-1.9			-3.5			-2.6
	ASP20	intra	-4.3	ASP20	intra	-0.4	ASP20	intra	-1.5
	GLU21	intra	-0.4	GLU21	intra	-0.1	GLU21	intra	-0.2
	ASP26	intra	-0.5	ASP26	intra	-0.1	ASP26	intra	-0.2
	LYS30	intra	0.2	LYS30	intra	0.0	LYS30	intra	0.2
	GLU34	intra	0.0	GLU34	intra	0.0	GLU34	intra	-0.1
				LYS48	intra	0.6	LYS48	intra	0.5
	GLU53	intra	-0.3	GLU53	intra	-0.3	GLU53	intra	-0.3
	LYS55	intra	0.4	LYS55	intra	0.6	LYS55	intra	0.5
	GLU57	intra	-1.5	GLU57	intra	-1.7	GLU57	intra	-1.2
	GLU59	intra	-3.5	GLU59	intra	-3.4	GLU59	intra	-2.3
	GLU78	intra	-0.1	GLU78	intra	-0.1	GLU78	intra	-0.3
	LYS81	intra	0.6	LYS81	intra	0.7	LYS81	intra	0.8
				LYS82	intra	0.1	LYS82	intra	0.4
	HIS83	intra	0.0	HIS83	intra	0.0			
HIS84	intra	0.0	HIS84	intra	0.0				
			ARG88	intra	3.1	ARG88	intra	2.9	
GLU90	intra	-0.7	GLU90	intra	-0.7	GLU90	intra	-0.8	
Intra-sum		-10.1			-1.6			-1.7	
Total sum		-12.0			-5.1			-4.3	

(F) Arg88

	mutants								
	Ec0VW_T88R			Ec0VW_6			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy		pairs	energy	
Arg88	N-terminal	inter	0.2	N-terminal	inter	0.1	N-terminal	inter	0.3
							ASP3	inter	0.0
							GLU4	inter	-0.2
							LYS5	inter	0.0
	LYS35	inter	0.2	LYS35	inter	0.1	LYS35	inter	0.1
				ASP39	inter	-5.4	ASP39	inter	-2.5
	LYS67	inter	0.9	LYS67	inter	1.3	LYS67	inter	0.7
				HIS98	inter	0.0			
	ASP100	inter	-5.0	ASP100	inter	-5.4	ASP100	inter	-7.8
							GLU101	inter	-1.9
	ASP102	inter	-16.0	ASP102	inter	-13.8	ASP102	inter	-13.0
							GLU108	inter	-0.8
	ARG112	inter	0.5	ARG112	inter	1.0	ARG112	inter	0.7
	C-terminal	inter	0.0	C-terminal	inter	0.0			
	Inter-sum		-19.2			-22.1			-24.4
	ASP20	intra	0.0	ASP20	intra	-0.1	ASP20	intra	-0.2
	ASP26	intra	0.0	ASP26	intra	0.0	ASP26	intra	-0.1
	LYS30	intra	0.1	LYS30	intra	0.1	LYS30	intra	0.2
							GLU34	intra	-0.1
				LYS48	intra	2.9	LYS48	intra	2.1
	GLU53	intra	-2.3	GLU53	intra	-1.9	GLU53	intra	-1.3
	LYS55	intra	0.9	LYS55	intra	0.9	LYS55	intra	0.9
	GLU57	intra	-2.0	GLU57	intra	-1.8	GLU57	intra	-1.0
	GLU59	intra	-2.7	GLU59	intra	-2.6	GLU59	intra	-1.7
GLU78	intra	-0.2	GLU78	intra	-0.2	GLU78	intra	-0.9	
LYS81	intra	2.5	LYS81	intra	2.5	LYS81	intra	3.8	
			LYS82	intra	0.3	LYS82	intra	0.6	
HIS83	intra	0.0				HIS83	intra	0.0	
			HIS84	intra	0.1				
			LYS87	intra	3.1	LYS87	intra	2.9	
GLU90	intra	-3.6	GLU90	intra	-5.1	GLU90	intra	-4.9	
Intra-sum		-7.5			-1.8			0.2	
Total sum		-26.7			-23.9			-24.2	

(G) Arg25

	mutants					
	Ec0VW_T101E			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy	
Glu101				LYS48	inter	0.0
				GLU53	inter	0.0
	GLU78	inter	2.6	GLU78	inter	2.4
	LYS81	inter	-2.3	LYS81	inter	-3.6
				LYS82	inter	-0.4
				LYS87	inter	-0.1
				ARG88	inter	-1.9
	GLU90	inter	0.0	GLU90	inter	0.2
	Inter-sum		0.3			-3.4
	N-terminal	intra	-11.2	N-terminal	intra	-6.1
	ASP3	intra	2.1	ASP3	intra	3.8
	GLU4	intra	1.1	GLU4	intra	2.7
	LYS5	intra	-0.2	LYS5	intra	-0.5
				ASP39	intra	0.0
	LYS67	intra	0.0	LYS67	intra	0.0
			HIS98	intra	-0.5	
ASP100	intra	5.5	ASP100	intra	6.3	
ASP102	intra	4.4	ASP102	intra	5.3	
			GLU108	intra	2.5	
ARG112	intra	-0.3	ARG112	intra	-0.4	
C-terminal	intra	0.1				
Intra-sum		1.5			13.3	
Total sum		1.7			9.9	

(H) Glu101

	mutants					
	Ec0VW_Q25R			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy	
Arg25	ASP20	inter	0.0			
	GLU21	inter	-0.2	GLU21	inter	-0.2
				LYS48	inter	0.5
	LYS55	inter	0.3	LYS55	inter	0.2
	GLU57	inter	-2.6	GLU57	inter	-1.9
	GLU59	inter	-1.5	GLU59	inter	-1.4
				LYS87	inter	0.0
	GLU90	inter	-0.6	GLU90	inter	-0.2
	Inter-sum		-4.6			-3.1
	ASP20	intra	-2.6	ASP20	intra	-2.8
	GLU21	intra	-5.2	GLU21	intra	-5.6
	ASP26	intra	-5.2	ASP26	intra	-4.7
	LYS30	intra	0.7	LYS30	intra	0.7
	GLU34	intra	-0.1	GLU34	intra	-0.1
	LYS35	intra	0.0			
			ASP39	intra	-0.8	
GLU59	intra	0.0				
LYS67	intra	0.2	LYS67	intra	0.2	
HIS83	intra	0.1				
GLU90	intra	0.0	GLU90	intra	0.0	
Intra-sum		-12.1			-13.0	
Total sum		-16.6			-16.1	

(I) Glu108

	mutants					
	Ec0VW_N108E			Ec0VW_9		
	pairs	energy		pairs	energy	
Glu108				ASP3	inter	0.0
	GLU4	inter	0.4	GLU4	inter	0.5
	LYS5	inter	-0.2	LYS5	inter	-0.4
				LYS48	inter	0.0
	GLU53	inter	0.8	GLU53	inter	0.5
	LYS81	inter	-0.1			

#### (5) Ec0VV\_6 への更なる荷電性残基導入による蛋白質の熱安定化

Ec0VV\_6 を鋳型としてさらに荷電性残基の導入を検討した。E34R(+2.5°C), E57R (+4.9°C), S110R(+4.1°C)一残基置換は、それぞれ静電相互作用が増加し、 $T_d$ が増加していたが、Ec0VV\_6 E57R(+23.6°C) は  $T_d$  が変化せず、Ec0VV\_6 E34R(+20.6°C) と Ec0VV\_6 S110R(+22.1°C)は Ec0VV\_6 よりも不安定化し、分子全体での静電相互作用も低下していた。

一方、Q25R, T101E, N108K の 3 変異を Ec0VV\_6 に導入した Ec0VV\_9 変異型では Ec0VV\_6 と比較して  $T_d$  が 5.4°C 増加した。Ec0VV\_9 変異型において、Ec0VV\_6 変異型に導入している 6 つの荷電性残基に関しては Ec0VV\_6 とほぼ同様の静電相互作用を保持していた(Table 3)。新たに導入した Arg25 の静電相互作用は Ec0VV\_9 変異型においても、一残基置換型の場合と同様であった。Glu101 は一残基変異型、Ec0VV\_9 変異型、いずれにおいても静電相互作用の低下が示唆されたが、実際の変性温度は増加した。101 位は  $\alpha$ -Helix 3 の N 末端に位置するため、負荷電残基導入による Helix dipole moment の強化で安定化したものと考えられる。Glu108 では一残基置換、Ec0VV\_9 変異型ともに静電相互作用の変化は小さかった。108 位は  $\alpha$ -Helix 3 に位置しているが、正荷電残基変異型 N108K, N108R においても共に安定性は増加していた(N108E, N108K, N108R 変異型の  $\Delta T_d$  は それぞれ、+2.1, +2.8, +2.3°C)。そのため、静電相互作用以外の要因で安定化していると考えられる。鋳型の Asn よりも Glu, Arg, Lys の方が Helix propensity が高いことが知られているため、2 次構造強化によって、熱安定性が増加したものと考えられる。

#### (まとめ)

本研究では、荷電性残基導入によって大腸菌由来 CutA1 蛋白質の熱安定性を超好熱菌レベルにまで上昇させることで変性温度( $T_d$ )150°Cの蛋白質を再現することを目指した。網羅的な荷電性残基一残基変異導入によって安定性が增加する変異型を多数取得したが、一残基導入によって最も安定性が増加した変異型の場合でも+5°C程度の増加であった。そのため、蛋白質の熱安定性を超好熱菌レベルまで高めるためには、数多くの荷電性残基を導入して静電相互作用を顕著に増加させなければならないことが示唆された。そこで、多重変異型を作製した結果、最も熱安定性が増加した変異型で、野生型と比較して  $T_d$  が 52.3°C 増加した。

安定性が増加した荷電性残基変異型について、MD シミュレーションを行うことで、導入した荷電性残基の挙動と得られる静電相互作用の増減を評価した。その結果、荷電性残基導入によって増加した静電相互作用と変性温度の増加との間には、高い相関が見られた。つまり、静電相互作用を増加させるように荷電残基を導入すれば、熱安定性の高い蛋白質を作製することが出来得ると考えられる。しかしながら、静電相互作用が低下した変異型であっても、安定性増加の要因が静電相互作用以外(例えば Helix Dipole 強化、2 次構造の propensity 等)の場合は、熱安定性が増加していた。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計2件)

Y. Matsuura, M. Takehira, G. I. Makhatadze, Y. Joti, H. Naitow, N. Kunishima, and K. Yutani: Strategy for Stabilization of CutA1 proteins due to ion-ion interactions at temperatures of over 100 °C. *Biochemistry* (査読有) **57**, 2649–2656. (2018)

K. Yutani, Y. Matsuura, H. Naitow, and Y. Joti:

Ion-ion interactions in the denatured state contribute to the stabilization of CutA1 proteins.

*Sci Rep.* (査読有) **8**, 7613. (2018)

### [学会発表](計3件)

松浦 祥悟、竹平 美千代、城地 保昌、内藤 久志、小野 直子、国島 直樹、油谷 克英:  
“荷電性残基の挙動を MD simulation により評価することで明らかになった蛋白質の熱安定化に果たす静電相互作用の役割”

第 17 回日本蛋白質科学会年会 (2017)

油谷 克英、松浦 祥悟、竹平 美千代、内藤 久志、城地 保昌:

“蛋白質の変性状態における荷電性残基の特徴:高温での MD simulation”

第 17 回日本蛋白質科学会年会 (2017)

松浦 祥悟、竹平美千代、小野直子、国島直樹、油谷克英:

“網羅的な荷電性残基変異型の安定性変化のデータから明らかになった高温での熱安定化戦略” 第 16 回日本蛋白質科学会年会 (2016)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

### (2) 研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。