

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03663

研究課題名(和文) 膜蛋白質を耐熱化させるアミノ酸置換の理論的予測法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Theoretical Method of Predicting Thermostabilizing Mutations for Membrane Proteins

研究代表者

木下 正弘 (Kinoshita, Masahiro)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：90195339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：7回膜貫通ヘリックス構造を有する膜蛋白質に対し、立体構造なる微視的幾何学情報から熱安定性を評価できる統計力学理論を構築した。膜を構成する炭化水素基集団の並進配置エントロピーの効果を取り込んだ点に独創性がある。G蛋白質共役型受容体(GPCR)に対し、BW数が3.39の残基をリジンまたはアルギニンに置換すると、クラスAの数多くの異なる不活性型GPCRを耐熱化できることを発見し、そのうちの幾つかに対して立体構造の新たな決定に成功した。ロドプシンであるTRとXRあるいはRxRとHsBRは、高いアミノ酸配列相性にも拘わらず、顕著に異なる熱安定性を呈する。これらの実験事実は上記理論を用いて説明できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜蛋白質は水環境中にある細胞外・細胞内領域と無極性環境中にある膜内領域から成り、水溶性蛋白質よりも複雑である。現在市販されている薬の60%以上が膜蛋白質を標的としているが、その安定性が低いため、立体構造決定や精製標品を用いた薬剤のスクリーニング系の開発が困難である。本研究によって、7回膜貫通ヘリックス構造を有する膜蛋白質の折り畳みの物理描像がほぼ完成され、かつ、アミノ酸置換による膜蛋白質の安定性向上を論理的に実現することが可能となった。各膜蛋白質に関連する生命機能や疾病原因の理解、様々な病気の治療薬の開発などに至る我が国のライフサイエンスの推進に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：For seven-transmembrane proteins, we developed a statistical-mechanical theory enabling us to evaluate the thermostability from the structures, microscopic geometric characteristics. An originality of the theory is the incorporation of effects of translational, configurational entropy of hydrocarbon groups within the lipid bilayer. We found that mutating the residue at a position of NBW=3.39 (NBW is the BW number) to Lys or Arg leads to substantially higher thermostability for significantly many GPCRs of Class A in the inactive state. The structures of some of them were newly determined. TR and XR or RxR and HsBR (rhodopsins) are quite different in the thermostability despite their high sequence similarity. These experimental facts could be elucidated by our theory.

研究分野：生物物理学

キーワード：膜蛋白質 G蛋白質共役型受容体 ロドプシン 耐熱化 アミノ酸置換 統計熱力学 積分方程式論 エントロピー

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。

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜蛋白質は細胞の機能発現に不可欠な種々の役割を担っており、現在市販されている薬の60%以上が膜蛋白質を標的としている。創薬のためには、標的膜蛋白質のX線結晶構造解析等による3次元立体構造決定や、精製標品を用いた薬剤のスクリーニング系と評価系の開発が重要となるが、膜蛋白質の立体構造が崩れ易い(安定性が低い)ことが大きな障害になっている。膜蛋白質を耐熱化させる(熱変性温度を高める)と、精製・結晶化のために膜蛋白質を界面活性剤中に取り出すことなどの他の要因に対してもより安定となる。この耐熱化を論理的に行う方法の確立が急務である。

(2) 膜蛋白質は、細胞膜内貫通部位 (transmembrane portion: TMP)・細胞外部位 (extracellular portion: ECP)・細胞内部位 (intracellular portion: ICP)なる3つの部位から成る。TMPは無極性環境中に、ECPとICPは水溶液環境中にある。この点で水溶性蛋白質よりも複雑であり、かつ、(1)で述べた理由によって立体構造が不明であることが多く、膜蛋白質の研究は水溶性蛋白質のそれに比べて大きく遅れている。膜蛋白質の折り畳み機構の解明や熱安定性を記述するための統計熱力学理論の構築が強く望まれる。

2. 研究の目的

(1) アミノ酸置換によって膜蛋白質を耐熱化させることが有力視されている。現在のところ、各アミノ酸をアラニンに置換し、それらすべての置換型の熱安定性を実験によって調べ、耐熱化をもたらしたものを選り出すという方法が採用されている。しかし、この方法には、「アラニンへの置換に限られていること」や「多大の労力が要求されること」などの欠陥がある。実験に頼らない方法も提案されているが、これらは、「やはりアラニンへの置換に限られていること」や「主に経験則に基づいているため、安定化をもたらす置換が見つかってその物理起源が分かり難い」などの問題点を抱えている。本研究では、可能なあらゆるアミノ酸置換を効率良く吟味し、耐熱化に繋がる置換を理論的に予測可能とする新しい方法を開発する。

(2) (1)で述べた目的を達成するためにも、膜蛋白質の折り畳みを推進あるいは妨害する物理因子を特定し、それらの相対的重要性を検討し、立体構造なる微視的な幾何学的特性と熱安定性なる巨視的な物性を結び付ける統計力学理論を構築する。変性構造のモデリングと共に、折り畳みに伴うシステム(膜・膜蛋白質・水溶液で構成される)の自由エネルギー低下を記述できる関数を開発する。耐熱化に繋がるアミノ酸置換を予測可能とする新しい方法の開発に発展させるため、置換型の立体構造が不明の場合や野生型のそれさえ不明の場合とも取り組む。膜蛋白質の中でも特に重要なGタンパク質共役型受容体(GPCR)やロドプシンなどの7回膜貫通型(7本のヘリックスを有する)を中心に扱う。

3. 研究の方法

(1) 2種類の膜蛋白質やある膜蛋白質の野生型と置換型の「熱安定性」について議論する場合、立体構造の視覚的な比較や分子動力学シミュレーションによる微視的情報だけでは不十分であり、「熱力学」が不可欠になる。立体構造なる微視的な幾何学的特性と熱安定性なる巨視的な物性を結び付ける統計力学理論を構築しなければならない。

(2) 膜蛋白質の折り畳み(構造形成)に伴うシステムの自由エネルギー低下 ΔF (<0)を計算する。膜蛋白質は、TMP・ECP・ICPなる3つの部位から成る(図1参照)。第1段階として、 ΔF がTMPの構造形成に伴う自由エネルギー低下に支配されると仮定する。この仮定は、GPCRに対しては妥当であるものと考えられる。 ΔF はエネルギー成分 ΔU (<0)とエントロピー成分 ΔS (>0)から成る($\Delta F = \Delta U - T\Delta S$; T は絶対温度)。膜を構成する炭化水素基集団が熱運動することに起因するエントロピー効果を主要因子と考える。以下より、炭化水素基集団を「溶媒」と呼ぶ。 $|\Delta F|$ が大きいほど熱安定性が高いということになる。

(3) $|\Delta F|$ が大きくなるアミノ酸置換を予測する。ただし、野生型と置換型の立体構造が入力データとして与えられるものとする。アラニンへの置換に限らず可能なあらゆる置換を調べるため、 ΔF は高速で計算できなければならない。そのため、物理エッセンスを大切にしながらも、

論理的に出来る限りの簡略化を行う。我々は、以下のことを示した: 無極性環境中では、「蛋白質分子内水素結合形成が蛋白質-溶媒間の水素結合の切断を伴わずにそのままエネルギー低下に繋がること」および「溶媒分子が熱運動(並進移動)していること自体が重要であり、溶媒分子構造の詳細は必ずしも考慮しなくてよい」。溶媒は単純流体としてモデル化する。膜中の炭化水素基集団の並進配置の微視的状態数に対応するエントロピーが出来る限り高くなる立体構造が望まれるという効果を ΔS 中に導入する。折り畳みに伴う分子内水素結合形

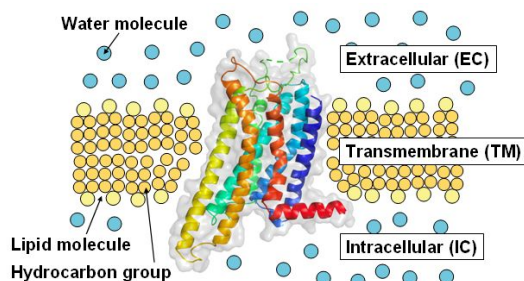


図1: Adenosine A_{2a} receptor (A_{2a}R)

成に代表される蛋白質分子内静電相互作用エネルギー低下が出来る限り大きくなる立体構造が望まれるという効果を ΔU 中に導入する。

(4) 基本となる排除容積効果について説明する。溶媒分子集団の中に溶質を挿入すると、溶媒分子の中心が入れない空間すなわち排除空間が生成する。溶質が直径 d_L の球、溶媒分子が直径 d_s の球のとき、排除空間は直径 d_L+d_s の球になる。排除空間の生成は、溶質と共存する溶媒分子集団の並進移動に利用可能な空間の容積を減らし、溶媒分子集団の並進の自由度を低下させる。いま、溶質同士が接触したとすると、2つの排除空間に重なりが生じ、重なり部分の容積だけ、トータルの排除空間の容積(排除容積)が減少する。結果として、溶質と共存する溶媒分子集団の並進移動に利用可能な空間の容積が増加し、溶媒分子集団の並進配置の微視的状态数が増加する。これによる溶媒のエントロピー利得が推進力となり、溶質同士の接触が促進される効果が生じる。蛋白質の場合、図2に示す側鎖の充填が、大幅な排除容積の減少と溶媒のエントロピーの増加をもたらす。

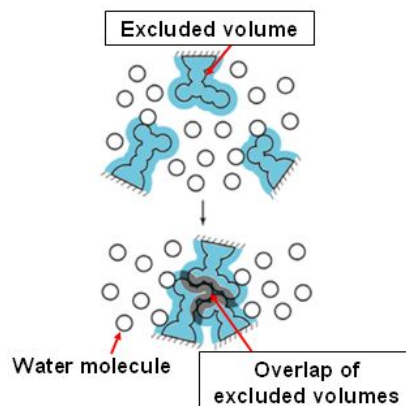


図2: 側鎖の密な充填

(5) 主な武器は積分方程式論と形態計測学(複雑な物の形を定量的に扱う学問)的アプローチである。積分方程式論では、システムの分配関数から出発し、種々の分布関数(相関関数)を定義しつつ、それらの間に成立する関係式を導き出す。関係式を数値的に解くことにより、溶質近傍における溶媒の微視的構造や溶媒和の熱力学量を計算できる。平衡構造・物性に関する限り、分子動力学シミュレーションと同レベルの解析が可能である。ただし、無限に大きなシステムを対象とし、無限個の微視的状态に対して物理量の平均をとることができる。形態計測学的アプローチでは、蛋白質の立体構造を4個の形態指標(排除容積、露出表面積、平均曲率およびガウス曲率の積分値)で代表させる。このアプローチには2つ大きな利点がある。1つ目は、複雑な多原子構造を有する大きな蛋白質の溶媒和エントロピーを超高速で計算できること。2つ目は、溶媒和エントロピーを種々の成分に分解し、物理的に意味のある議論が可能になること。

(6) 野生型の立体構造のみが分かっている場合、置換型の立体構造はモデラーと呼ばれる計算機プログラムを用いて作成する。実践的には、野生型の立体構造すら分かっているものを鋳型として、ホモロジーモデリングを用いて野生型のモデル立体構造候補を複数個作成する。そして、それらの中から $|\Delta F|$ が最大になる構造をモデル立体構造として選定する。

4. 研究成果

(1) 膜蛋白質の変性機構

膜蛋白質の変性を駆動する因子は、変性に伴う蛋白質の構造エントロピー S_C の利得である。 S_C の利得は、以下に述べるように T の増加関数である。変性状態の $S_C(=S_{C,D})$ は天然状態の $S_C(=S_{C,F})$ よりもずっと大きい。 S_C は二面角に許される値の範囲(以下、単に「範囲」と書く)で決まり、この範囲はねじれエネルギー $E_{torsion}$ と T に依存する。低い T では十分に低い $E_{torsion}$ しかとり得ず、範囲は狭くなる。 T が高くなるほど高い $E_{torsion}$ をとる確率も高くなり、範囲は広がる。天然状態では主鎖や側鎖が密に充填されており、範囲が広がってもとり得る立体構造数はあまり増加しないが、拘束の少ない変性状態ではより大きく増加する。つまり、 $\Delta S_C=S_{C,D}-S_{C,F}$ は T の増加関数となり、 $T\Delta S_C$ はさらに強い増加関数となる($-\Delta F$ の T への依存性は遥かに弱い)。このことが原因で、 T がある程度高くなると蛋白質は変性するのである。

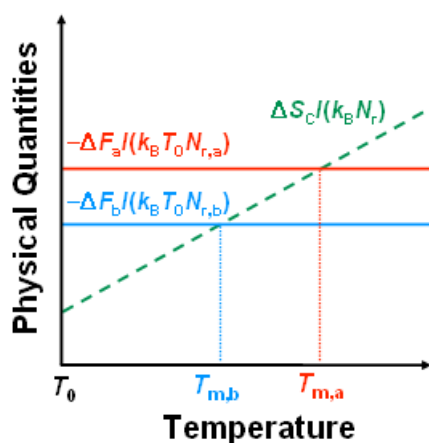


図3: 膜蛋白質の変性

2種類の膜蛋白質 a, b の熱変性温度 T_m の比較を図3(k_B はボルツマン定数)に示す。 $\Delta S_C/N_r$ は蛋白質の種類(アミノ酸配列)に依らずほぼ同じになるが、 $-\Delta F/N_r$ はそれにかかなり依存する。 $T=T_0=298$ K で計算される $-\Delta F/N_r$ (N_r はアミノ酸残基数)が大きいほど、 T_m が高くなる。つまり、 $-\Delta F/N_r$ ($T=298$ K)は熱安定性の指標となる。ただし、同じ蛋白質の野生型と置換型の熱安定性を比較する場合、 $-\Delta F$ を N_r で割る必要はない。

(2) アデノシン受容体 A_{2a}R (adenosine A_{2a} receptor)の耐熱化

耐熱化においては、現在までにクラス A の GPCR の不活性型に対して多くの成果が得られている。A_{2a}R を取り上げ、実測された野生型の立体構造を用い、置換型の立体構造はモデラーを用いて作成した。T88 と S91 のそれぞれ 19 通りの置換に対して ΔF を計算し、 $\Delta\Delta F/(k_B T) < \Phi$ ($\Delta\Delta F$ = 変異体の ΔF - 野生型の ΔF) を満たすものを安定化置換型、そうでないものを不安定化置換型として区別した。それらの中から 9 個の置換型を選び、安定化置換型と予測された 1 個の 2 重置換型を加えて、実際に安定化しているか否かを実験で調べた。実験では、熱変性温度 T_m が高くなるもの(a)、あるいは、35°C で保持したときに 50%の立体構造が崩れてしまう時間が長くなるもの(b)を安定化置換型と考えた。的中率は、 Φ を 0 にするか -5 にするか、(a)と(b)のうちのいずれかで判断するかによって異なるが、実に 8/10 ~ 10/10 に達した。ここで、的中率とは、安定化すると予測された置換を実験で調べて実際に安定化した確率である。2 個の置換型(T88E, S91K)では T_m が約 7°C 上昇し、2 重置換型(T88E-S91R)では約 12°C 上昇した。

(3) 耐熱化をもたらすアミノ酸置換の予測における高い的中率の達成

実験的に分かっている野生型と変異体の立体構造を使用できる場合、こういう場合はあまり多くないにしても、どちらがより安定かを射当ててことに今まで失敗したことがない(例: A_{2a}R の野生型と安定化 8 置換型の不活性型; A_{2a}R の野生型と安定化 4 置換型(L48A, A54L, T65A, Q89A)の活性型)。つまり、我々の方法では、安定性の立体構造への依存性を的確に考慮できていることになる。しかし、これは、裏を返せば、立体構造が不正確なら成功しないということを示唆している。野生型の立体構造すら分かっていない場合には、アミノ酸配列の相同性が高くかつ立体構造が分かっているものを鋳型として、広く使われているホモロジーモデリングを用いて野生型のモデル立体構造候補を複数個作成する。そして、それらの中から $|\Delta F|$ が最大になる構造をモデル立体構造として選定する。的中率は相同性の高さに大きく依存する。A_{2a}R の不活性型(実測された野生型の立体構造はわざと使用しない)では相同性が 34%に達する鋳型が見つかったのでの中率は 5/7 と高かったが、17%の鋳型しか見つからなかった prostaglandin E receptor 4 (EP4) (プロスタグランジン受容体)の不活性型では 2/10 と低かった。野生型のモデル立体構造の作成プロセスの改良が今後の課題である。

(4) ホットスポットの発見

GPCR に対する鍵残基とホットスポットを発見した。鍵残基とは、「それを置換して得られる変異体の多くが耐熱化する」残基であり、各 GPCR に複数個存在する。数多くの GPCR に保存され共通に鍵残基となる残基がホットスポットである。クラス A の GPCR の不活性型に対しては、Ballesteros-Weinstein (BW)数 3.39 の残基がホットスポットの 1 つであることを特定できた。それをアルギニンまたはリジンに置換することにより、A_{2a}R, muscarinic acetylcholine receptor 2 (M2R) (ムスカリン性アセチルコリン受容体), EP4, などの数種類の GPCR の安定化に実際に成功している(A_{2a}R の場合, S91R, S91K が大きな安定化をもたらした)。これらの成果は、日経産業新聞(見出し: 受容体の耐久性向上)と日刊工業新聞(見出し: 多くの医薬品の結合標的たんぱく質耐熱化法を発見)に報道された。ここで、BW 数は $x.yz$ の 3 つの数字で表される。 x はその残基が第 x ヘルックスに存在することを表す。 yz は第 x ヘルックスの中で最も良く保存されている残基を 50 とした時に、考えている残基が存在する位置を表す。例えば BW 数が 5.52 とあった場合、第 5 ヘルックスの最も良く保存されている残基から 2 つ C 末端側の残基を表す。

一部水和した Na⁺が A_{2a}R の真ん中のポケット内の表面に結合していることが見出され、このような結合がクラス A の GPCR の不活性型立体構造の安定化に大きく寄与するという考え方がある。ポケット内には空洞があり、かつ、その表面の全電荷は負である。我々の解釈によると、Na⁺と表面の静電引力相互作用によって空洞が狭くなり、エネルギー的安定化のみならずエントロピー的安定化にも繋がる。ホットスポットはポケット内の表面にあり、「Na⁺が存在しなくてもホットスポットが正電荷を持つ残基で置換されると同様の安定化が起こる」という考え方ができる。A_{2a}R, M2R, EP4 におけるホットスポットのアルギニンまたはリジンへの置換に対しては、 $\Delta\Delta U$, $-\Delta\Delta S$, $\Delta\Delta F$ のすべてが例外的に大きな負の値になることが確認できている。

無論、ホットスポット以外のアミノ酸を置換するほうがより大きな安定化に繋がる場合がある。例えば、5-HT_{2A} serotonin receptor (セロトニン受容体)の不活性型立体構造では、ホット

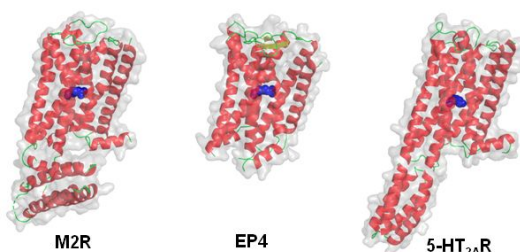


図4: ホットスポットの発見によって解かれた結晶構造

スポットのアルギニンまたはリジンへの置換によって安定化が得られたが、それよりも大きな安定化に繋がる他の置換が見つかる。さらに、ホットスポットの置換では安定化が得られない場合も存在する。そのような場合にも、我々の方法が有用になることが示されている。

ホットスポットの発見によって解かれた M2R, EP4, 5-HT_{2A}R (不活性型)の結晶構造を図 4 に示す($N_{BW}=3.39$ の残基 (R110 in M2R, R106 in EP4, or K162 in 5-HT_{2A}R)を青い球で描いている)。

GPCR の活性型に対しても成果が得られ始めている。最近、M2R の活性型立体構造のアミノ酸置換による安定化に成功した。アンタゴニストとの親和性が大きく減少し、アゴニストとの親和性が約 60 倍も高くなった。

(5) 理論のロドプシンへの拡張

上記の理論的同定法をロドプシンにも適用できるように拡張した。ロドプシンでは、TMP のみならず ECP および ICP をも含めて自由エネルギー関数を構築する必要が生じた。水溶液環境中および無極性環境中における構造形成に伴うエネルギー的およびエントロピー的物理因子の変化を図 5 に要約する。

	(1) In aqueous environment	(2) In nonpolar environment
Energetic	(a) Energy decrease by formation of protein intramolecular hydrogen bonds (HBs)	(a) Energy decrease by formation of protein intramolecular HBs
	(b) Energy increase by loss of water-protein HBs	
	(c) Energy decrease by partial recovery of water-water HBs	
	$ (b) > (a) + (c) $: Net change in energy is positive.	(a): Net change in energy is negative.
	(d) Energy decrease by gain of intramolecular van der Waals (vdW) attractive interaction	(d) Energy decrease by gain of intramolecular vdW attractive interaction
Entropic	(e) Energy increase by loss of water-protein vdW attractive interaction	(e) Energy increase by loss of solvent-protein vdW attractive interaction
	$ (d) > (e) $	$ (d) > (e) $
	(f) Gain of water entropy For (f), the translational entropy is much larger than the rotational one.	(f) Gain of solvent entropy
	(g) Loss of conformational entropy	(g) Loss of conformational entropy
	$ (f) \gg (g) $ at 298 K.	$ (f) \gg (g) $ at 298 K.

図 5: 水溶液環境中および無極性環境中における膜蛋白質の構造形成に伴うエネルギー的およびエントロピー的物理因子の変化

様に、スクロース・グルコース・マニトール・エリスリトール・グリセロールの添加は安定化の向上に繋がり、その強さは $> \sim >$ の順番に従い、プロパノールの添加は安定化の低下をもたらすことを予言した。その後、膜蛋白質として TR と A_{2a}R を選定し、この予言が正しいことを実験的に確認した。

(8) 立体構造、機能および熱安定性の統計力学による橋渡し

蛋白質の熱安定性を議論するためには「熱力学」が必要である。立体構造という微視的な幾何学的情報と熱力学的特性の連結法の確立は、生物物理学における未解決の最重要課題の 1 つである。

RxR と HsBR (いずれもロドプシンに属する) はアミノ酸配列の相同性が非常に高いにも拘わらず、RxR の方が遥かに熱安定性が高い。本研究で RxR の結晶構造を初めて解いたが、驚いたことに、主鎖に対しては RxR と HsBR はほとんど同じ立体構造を有していた。こうしたことは膜蛋白質でしばしば見られる。各原子の x-y-z 座標と力場パラメータのみから熱安定性を評価できる方法論を構築し、RxR と HsBR なる顕著な例に適用してその有効性を実証した。さらに、RxR では、プロトンポンプとしての本来の機能を保持できるように巧妙に耐熱化を実現していることを示した。

TR (thermophilic rhodopsin) は膜蛋白質としては例外的に高い熱安定性を持つ。TR と XR (xanthorhodopsin) は高いアミノ酸配列相同性と立体構造の類似性を有するにも拘わらず、TR の熱安定性は XR のそれよりも遥かに高い。新しい自由エネルギー関数を用いて、TR の方が遥かに安定であることを示すと共に、そのような違いが生じる物理要因を特定することができた。

(6) 既に高い熱安定性を有するロドプシンのさらなる耐熱化

GPCR のように本来安定性の低い膜蛋白質の安定化と異なり、TR のようにアミノ酸配列がほぼ最適化された膜蛋白質 (熱変性温度が 91.8 と例外的に高い) を本来の機能を保持させつつ安定化することは非常に難しいと考えられる。後者に対して有効と考えられる別の耐熱化アミノ酸置換の理論的同定法を考え、それを TR に適用した。理論的に予言した二重置換によって熱変性温度が 100 度近くまで上がると同時に、TR のプロトンポンプとしての機能も保持されることを確認した。TR を新しい高機能性材料として使用できるものと期待される。

(7) 共溶媒の添加効果

あらゆる蛋白質に対して、糖やアルコールなどの共溶媒の添加が熱安定性に及ぼす影響を統一的に説明できる理論を構築した。膜蛋白質に対しても、水溶性蛋白質の場合と同

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 24件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 S. Yasuda, K. Kazama, T. Akiyama, M. Kinoshita, T. Murata	4. 巻 301
2. 論文標題 Elucidation of Cosolvent Effects Thermostabilizing Water-Soluble and Membrane Proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 112403(1-10)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2019.112403	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 T. Hayashi, S. Yasuda, K. Suzuki, T. Akiyama, K. Kanehara, K. Kojima, M. Tanabe, R. Kato, T. Senda, Y. Sudo, T. Murata, M. Kinoshita	4. 巻 124
2. 論文標題 How Does a Microbial Rhodopsin RxR Realize Its Exceptionally High Thermostability with the Proton-Pumping Function Being Retained?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 990-1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.9b10700	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 S. Yasuda, T. Akiyama, S. Nemoto, T. Hayashi, T. Ueta, K. Kojima, T. Tsukamoto, S. Nagatoishi, K. Tsumoto, Y. Sudo, M. Kinoshita, T. Murata	4. 巻 60
2. 論文標題 Methodology for Further Thermostabilization of an Intrinsically Thermostable Membrane Protein with Its Original Function Being Retained Using Amino-Acid Mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 1709-1716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c00063	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 安田賢司, 林智彦, 村田武士, 木下正弘	4. 巻 52
2. 論文標題 サーモフィリックロドプシンの極めて高い熱安定性に関する統計熱力学的解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」, ニュー・サイエンス社	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 安田賢司, 林智彦, 村田武士, 木下正弘	4. 巻 4
2. 論文標題 サーモフィリックロドプシンとキサントロドプシンの熱安定性の大きな違いに対する統計熱力学解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ, 北隆館	6. 最初と最後の頁 31-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 M. Kinoshita, T. Hayashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Accurate and Rapid Calculation of Hydration Free Energy and Its Physical Implication for Biomolecular Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 469-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00686-5	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 T. Murata, S. Yasuda, T. Hayashi, M. Kinoshita	4. 巻 12
2. 論文標題 Theoretical Identification of Thermostabilizing Amino-Acid Mutations for a G-protein Coupled Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 323-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00678-5	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 Y. Kajiwara, S. Yasuda, S. Hikiri, T. Hayashi, M. Ikeguchi, T. Murata, M. Kinoshita	4. 巻 122
2. 論文標題 Physical Origin of Thermostabilization by a Quadruple Mutation for the Adenosine A2a Receptor in the Active State	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4418-4427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b00443	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 T. Hayashi, M. Inoue, S. Yasuda, E. Petretto, T. Skrbic, A. Giacometti, M. Kinoshita	4. 巻 149
2. 論文標題 Universal Effects of Solvent Species on the Stabilized Structure of a Protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 045105(1-17)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.504211110.1038/s41589-018-0131-3	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 該当する

1. 著者名 Y. Toyoda, K. Morimoto, R. Suno, S. Horita, K. Yamashita, K. Hirata, Y. Sekiguchi, S. Yasuda, M. Shiroishi, T. Shimizu, Y. Urushibata, Y. Kajiwara,, T. Hirokawa, M. Kinoshita, T. Murata, K. Takayama, M. Yamamoto, S. Narumiya, S. Iwata, T. Kobayashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ligand Binding to Human Prostaglandin E Receptor EP4 at the Lipid-Bilayer Interface	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0131-3	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 R. Suno, S. Lee, S. Maeda, S. Yasuda, K. Yamashita, K. Hirata, S. Horita, M.S. Tawaramoto, H. Tsujimoto, T. Murata, M. Kinoshita, N. Vaidehi, M. Yamamoto, B. K. Kobilka, S. Iwata, T. Kobayashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Structural Insights into the Subtype Selective Antagonist Binding to the M2 Muscarinic Receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1150-1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0152-y	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 S. Yasuda, T. Hayashi, Y. Kajiwara, T. Murata, M. Kinoshita	4. 巻 150
2. 論文標題 Analyses Based on Statistical Thermodynamics for Large Difference between Thermophilic Rhodopsin and Xanthorhodopsin in terms of Thermostability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 055101(1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5082217	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 S. Hikiri, T. Hayashi, M. Inoue, T. Ekimoto, M. Ikeguchi, M. Kinoshita	4. 巻 150
2. 論文標題 An Accurate and Rapid Method for Calculating Solvation Free Energies of a Variety of Solutes Including Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 175101(1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5093110	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 Y. Kajiwara, S. Yasuda, Y. Takamuku, T. Murata, and M. Kinoshita	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of Thermostabilizing Mutations for a Membrane Protein Whose Three-Dimensional Structure is Unknown	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Computational Chemistry	6. 最初と最後の頁 211-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.24673	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 S. Yasuda, Y. Kajiwara, Y. Toyoda, K. Morimoto, R. Suno, S. Iwata, T. Kobayashi, T. Murata, M. Kinoshita	4. 巻 121
2. 論文標題 Hot-Spot Residues to be Mutated Common in G Protein-Coupled Receptors of Class A: Identification of Thermostabilizing Mutations Followed by Determination of Three-Dimensional Structures for Two Example Receptors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6341-6350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.7b02997	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 T. Hayashi, S. Yasuda, T. Skrbic, A. Giacometti, M. Kinoshita	4. 巻 147
2. 論文標題 Unraveling Protein Folding Mechanism by Analyzing the Hierarchy of Models with Increasing Level of Detail	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 125102(1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.4999376	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 該当する

1. 著者名 木下正弘, 村田武士	4. 巻 75
2. 論文標題 膜タンパク質の耐熱化に繋がるアミノ酸置換の理論的予測	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 33-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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33件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 K. Kazama, S. Yasuda, T. Akiyama, M. Kinoshita, T. Murata
2. 発表標題 The influence of cosolvent on thermal stability of membrane proteins
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Yasuda, Y. Kajiwara, Y. Takamuku, N. Suzuki, Y. Toyoda, K. Morimoto, R. Suno, S. Iwata, T. Kobayashi, T. Murata, M. Kinoshita
2. 発表標題 Identification of thermostabilizing mutations for G-protein coupled receptors: Rapid method based on statistical thermodynamics
3. 学会等名 ImPACT野地プログラム国際シンポジウム “Artificial Cell Reactor Science and Technology”
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yasuda, T. Hayashi, Y. Kajiwara, T. Murata, M. Kinoshita
2. 発表標題 Statistical thermodynamics on the large difference between thermophilic rhodopsin and xanthorhodopsin in terms of thermostability
3. 学会等名 第79回岡崎コンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田武士, 木下正弘
2. 発表標題 統計熱力学に基づく膜タンパク質の熱安定化変異体予測法の開発
3. 学会等名 CREST / さきがけ合同成果報告会, 「生命を解き明かす~タンパク質構造から見えてくる世界~」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Yasuda, Y. Kajiwara, Y. Toyoda, K. Morimoto, R. Suno, S. Iwata, T. Kobayashi, T. Murata, M. Kinoshita
2. 発表標題 Theoretical identification of hot-spot residues to be mutated common in G protein-coupled receptors of class A
3. 学会等名 Biophysical Society 62nd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 M. Kinoshita	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 21
3. 書名 Springer Briefs in Molecular Science	

1. 著者名 木下正弘	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 -
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

木下研究室 - 京都大学エネルギー理工学研究所
<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/centerbunya/kinoshita/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----