

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15099

研究課題名(和文)統計熱力学計算に基づくロドプシンの熱安定化アミノ酸置換体の創出

研究課題名(英文)Creation of Thermostabilized Mutant for Rhodopsin Based on Statistical Thermodynamics

研究代表者

安田 賢司 (Satoshi, Yasuda)

千葉大学・大学院理学研究院・特任助教

研究者番号：40792081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サーモフィリックロドプシン(TR)とキサントロドプシン(XR)は高いアミノ酸相同性と非常に良く似た立体構造を持つ。しかし、その熱安定性はTRの方が遥かに高い。本研究では、膜タンパク質の安定性を的確に評価できる自由エネルギー関数(FEF)を構築し、TRの耐熱化メカニズムを解明した。また、FEFを用いてTRの耐熱化アミノ酸置換を予測し実験的に検証することで、TRの熱安定化置換体の創出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は現在市販されている薬の約6割の標的となっているが、その安定性が低いため立体構造解析や精製標品を用いた機能解析等が非常に困難である。膜タンパク質は水中環境にある細胞内・細胞外領域と無極性環境にある膜内領域からなり、水溶性タンパク質よりも安定性を司る因子の解明が遅れている。本研究結果により解明されたTRが極めて高い耐熱性を有するメカニズムは、他の多くの不安定な膜タンパク質の安定化への有力な指針となる。またTRの耐熱化置換体は光センサー等の高機能材料としての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although thermophilic rhodopsin (TR) and xanthorhodopsin (XR) share a high similarity in amino-acid sequence and an almost indistinguishable three-dimensional structure, TR is much more thermostable than XR. In this study, we develop the free-energy function (FEF) enabling us to evaluate the thermostability of membrane proteins and reveal the mechanism of thermostabilization of TR. Moreover, we identified the thermostabilizing mutation of TR using the FEF.

研究分野：生物物理学

キーワード：サーモフィリックロドプシン 耐熱化 アミノ酸置換 統計熱力学 積分方程式論 水素結合 エントロピー 共溶媒効果

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は生物が持つタンパク質の約30%を占めており、物質輸送、情報伝達、エネルギー変換など、生命維持のために不可欠な役割を果たしている。また、薬の標的としての重要性から、創薬研究の主要な対象となっている。しかし、膜タンパク質は一般に不安定であることが研究(特に結晶化及び三次元立体構造解析)の大きな障害となっており、膜タンパク質の耐熱化を論理的に行う方法の確立が求められる。しかし、膜タンパク質は一部が水中(以下、水中領域と呼ぶ)にあり、残りが脂質二重層中(以下、膜内領域と呼ぶ)にあるという複雑さのため、その安定性を司る物理因子が十分に解明されていないことが問題である。そのため、膜タンパク質立体構造情報と熱力学量を結びつける有力な統計熱力学的手法の構築が必要となる。

我々は先行研究にて水溶性タンパク質では、水分子の並進移動に起因するエントロピー効果が構造安定性に決定的に重要であることを理論解析により示してきた。タンパク質の主鎖や側鎖の存在は、水分子の中心が入れない空間を生成する。この空間の体積を排除体積という。タンパク質が折り畳むと、排除体積に重なりが生じトータルの排除体積が減少する(図a)。すると水分子が並進移動に利用可能な空間の容積が増加し、水の並進配置エントロピーが増加する。我々は膜タンパク質においても「細胞膜を構成する炭化水素基集団が熱運動することによって起因するエントロピー効果」が重要であると考え、それに基づき膜タンパク質用の自由エネルギー関数 FEF を構築した。タンパク質はアミノ酸置換により耐熱化する場合があることが知られているが、FEFを用いた耐熱化変異体の理論的予測手法の構築にも取り組んできた。この技術により、Gタンパク質共役型受容体の耐熱化置換体の安定化メカニズムの解明や、さらに大きく耐熱化するアミノ酸置換体の発見に成功している。

研究開始時、サーモフィリックロドプシン(TR)の存在が発見され、その立体構造が報告されていた。TRはキサントロドプシン(XR)と約55%という高い相同性を持ち、RMSDが0.87Åと立体構造も非常によく似ているにも拘らず、その熱安定性は大きく異なっており、当時世界最高の変性温度(約92°C)を有していた(図b)。このTRが極めて高い熱安定性を達成するメカニズムを解明することにより、他の多くの不安定な膜タンパク質の安定化への有力な指針が得られると考えられる。またTRをさらに耐熱化するアミノ酸置換体が発見できれば光センサー等の高機能材料としての利用が期待される。

2. 研究の目的

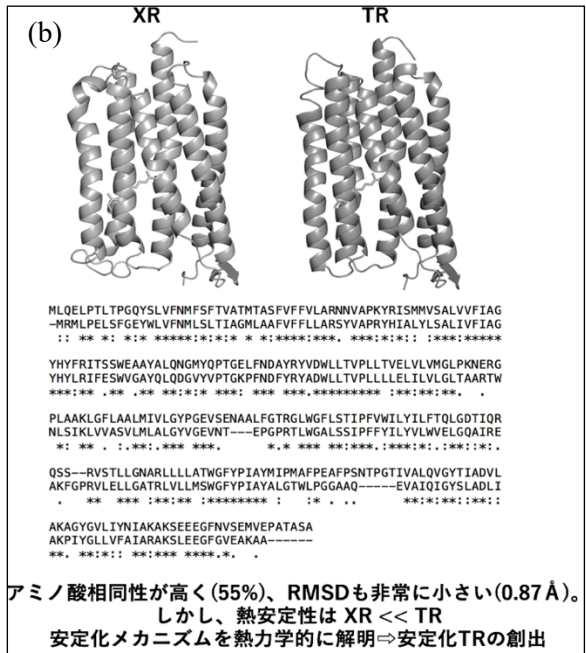
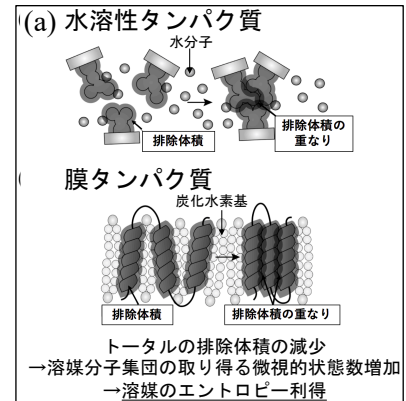
先行研究で開発したFEFは膜内領域に着目していたが、TRのような特異的に熱安定性の高い膜タンパク質は水中領域と膜内領域の両方が重要であると考えられる。そこで本研究ではFEFを改良することで、膜タンパク質の水中環境と膜内環境の両方を的確に計算できるようにし、それを用いてTRの高い耐熱性をもたらす物理因子を解明することを目的とする。さらに、その改良したFEFを用いてTRをさらに耐熱化するアミノ酸変異体を予測し、それを実験で検証することで、TRの耐熱化変異体を創出する。

3. 研究の方法

(1)自由エネルギー関数の改良

①エネルギー項の改良: FEFはエネルギー項 Λ とエントロピー項 S で構成される。 S は積分方程式論と形態計測学的手法を組み合わせた極めて正確性の高い統計熱力学的手法を用いて計算される。一方で Λ は分子内水素結合に着目して計算されるが、このときのパラメータは S と比較して正確性が劣る問題があった。そこで、いくつかの膜タンパク質に対して Λ を計算し、それをCHARMM力場で計算される静電相互作用エネルギー E と比較することで Λ の計算パラメータの改良を行う。

②水中領域への拡張: 水-膜-タンパク質系の全原子動力学シミュレーション(MD)を行うことで、膜タンパク質の膜内領域と水中領域を明確にする。膜タンパク質を膜内領域と水中領域にわけ、それぞれの Λ と S の値を異なるプロトコル、パラメータを用いて計算する。



様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

(2)膜タンパク質の安定性の解析方法

膜タンパク質が変性状態から天然構造に折り畳んだ時の自由エネルギー変化 ΔF を計算する。 ΔF がより負に大きな構造がより安定な構造である。変性状態は膜内領域ではヘリックスを引き離れた構造、水中領域では完全に伸びた構造であると仮定する。

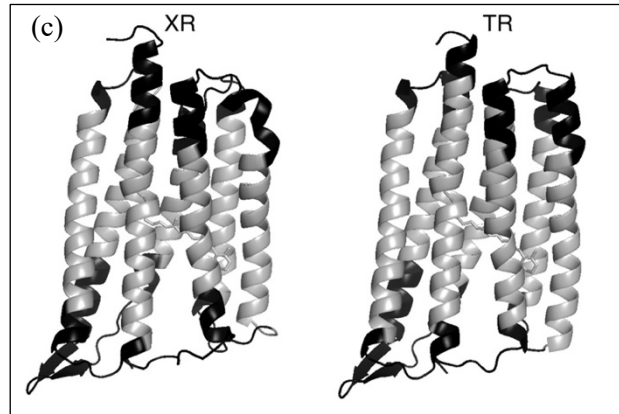
(3)耐熱アミノ酸変異体の予測方法

全ての1アミノ酸変異体を Modeller プログラムを用いて計算機内で作製し、それらの折り畳みに伴う自由エネルギー変化 ΔF を計算する。さらに野生型の ΔF との差 $\Delta\Delta F$ も計算する。 $\Delta\Delta F$ がより負に大きな変異体を安定化と予測される変異体として選出する。

4. 研究成果

(1)TR が極めて高い耐熱性を達成するメカニズムの解明

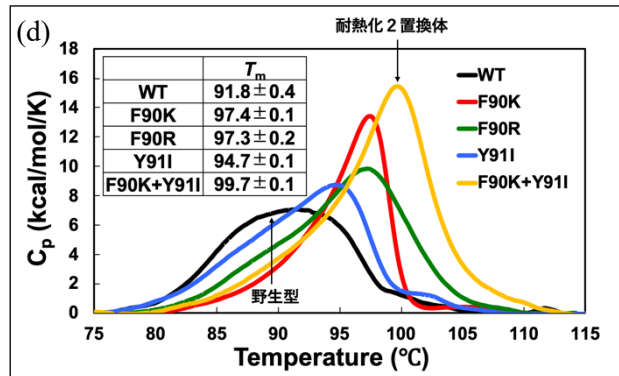
サーモフィリックロドプシン(TR)とキサントロドプシン(XR)の膜内(TM)領域と水中(WI)領域は TR と XR の結晶構造に対して全原子のMDを行うことで決定した。それぞれの領域に対して、エネルギー項を改良した自由エネルギー関数を用いて安定性を司る因子を解析した。その結果以下のことが判明した。TR は XR と比較して、TM 領域がより大きく、かつ、WI 領域の極性・荷電性アミノ酸が少ないという特徴があった(図 c は MD シミュレーションにより決定した水中領域と膜内領域を表している。水中領域は黒色、膜内領域は灰色で示している。)



これらの結果、エネルギーの観点で TR は TM 領域でのタンパク質の分子内水素結合のエネルギー利得を大きくしつつ、かつ WI 領域での脱水和のペナルティー(水-タンパク質間の分子間水素結合の損失)を小さくできる構造である。さらに、エントロピーの観点でも、TR は XR と比較してより密に主鎖と側鎖を充填することにより、大きな溶媒のエントロピー利得を獲得していることが分かった。すなわち、TR はエネルギーの観点でもエントロピーの観点でも極めて安定性の高い構造である。

(2)TR の耐熱化変異体の発見

元々の耐熱性が高い膜タンパク質である TR ではすでにアミノ酸配列がほぼ最適化されていると考えられる。そこで構造安定性への役割が小さいと考えられる、揺らぎの大きな側鎖を持つアミノ酸残基に着目して置換することで、効率的に耐熱化置換体を探索する手法を考案した。側鎖のゆらぎ大きなアミノ酸とは結晶構造において、電子密度が低い側鎖である。TR ではそのようなアミノ酸が5箇所あり、それらの残基に対して耐熱化変異体を予測し、実験で検証した。結果として、1置換で約5°C、2置換で約8°C



熱変性温度が向上する置換体の創出に成功した。さらに、水溶性タンパク質の安定化変異体の予測プログラムである FoldX により発見された水中領域の耐熱化変異体を組み合わせることで、TR の更なる耐熱化にも取り組んだ。膜内領域・水中領域でのさまざまな組み合わせの多置換体を検討した結果、最終的に熱変性温度が13度も向上(熱変性温度が105度)した安定化4変異体の創出に成功した。これらの熱変性温度は示差走査熱量測定(DSC)により厳密に決定した(図 d)。さらに、この4置換体はプロトンポンプとしてのロドプシンの機能を保持していることも実験的に確認された。これまでに報告されている最も熱安定性の高いロドプシンは後述する RxR であり、その熱変性温度は101度であるため、本研究で創出した耐熱化 TR 置換体は世界最高の熱変性温度を有するロドプシンである。

(3) R. xylanophilus rhodopsin の耐熱化メカニズムの解明

本研究開始後に TR よりも野生型の熱安定性の高いロドプシンである R. xylanophilus rhodopsin(RxR)の存在が発見された。RxR はバクテリオロドプシン HsBR と高いアミノ酸相同性をもつのも関わらず、熱安定性は RxR の方がはるかに高く変性温度は100°Cを超える。本研究

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

により RxR の立体構造が解明したが、主鎖に関しては RxR と HsBR はほぼ同じ構造を持っていた。そこで、自由エネルギー関数を用いて RxR が極めて高い耐熱性を持つメカニズムを解析した。その結果、RxR はエネルギーとエントロピーの両方の観点で安定な構造であることが判明した。これは TR の場合と酷似していたが水中領域においてタンパク質内の水素結合がより最適されている点が異なっていた。RxR はプロトンポンプの機能に重要なヘリックスのパッキングでは HsBR と大きく変わらず、その他のヘリックスがより密に充填していた。すなわち RxR がプロトンポンプの機能を保ちつつ極めて高い耐熱性を達成する巧妙なメカニズムを示した。

(4) 共溶媒効果による膜タンパク質の安定化

水溶性タンパク質の安定性は糖やアルコールなどの共溶媒の添加により変化することが実験的に知られている。これに関して、298K における折り畳みに伴う溶媒の並進配置エントロピー利得の大きさでタンパク質の熱安定性を評価できることが提案されている。水に糖やアルコールなど親水性の共溶媒が添加されると溶媒の充填率が高くなり、折り畳みに伴う溶媒のエントロピー利得が大きくなる結果、タンパク質の熱安定化がもたらされる。2 種類の糖(スクロース、グルコース)と 4 種類のアルコール(マンニトール、エリスリトール、グリセロール、2-プロパノール)に関しては、溶媒のエントロピーの計算結果からスクロース>グルコース~マンニトール>エリスリトール>グリセロールの順で安定化の効果が強いと考えられ、また、2-propanol は溶媒の充填率を下げることからタンパク質を不安定化されると考えられる。これらの計算結果の順番は実験結果と見事に一致することが分かっている。ここで、界面活性剤中の膜タンパク質について考える。界面活性剤のミセルは水中に存在するため、水の充填率が高くなるとミセルの炭化水素基の充填率も高くなることが期待される。その結果、膜タンパク質も共溶媒により安定化でき、さらにはその順番は上記の水溶性タンパク質に対する解析結果と一致すると考えられる。この仮説を検証するために、ミセル中の TR と A2aR に対して共溶媒の添加による熱安定性の変化を実験により検証した。結果として、両方の膜タンパク質において、共溶媒にスクロース、グルコース、マンニトール、エリスリトール、グリセロールを加えた場合は熱安定化し、その順番は上記の順番と完全に一致することが分かった。また、2-プロパノールを加えた場合は不安定化した。これらの結果は、ミセル中の膜タンパク質に対しても水のエントロピーが重要な役割を果たしていることを示すものであり、共溶媒の添加が不安定な膜タンパク質の安定化させる有力な手段となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuda Satoshi, Kazama Kazuki, Akiyama Tomoki, Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	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 ~ 112403
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 Hayashi Tomohiko, Yasuda Satoshi, Suzuki Kano, Akiyama Tomoki, Kanehara Kanae, Kojima Keiichi, Tanabe Mikio, Kato Ryuichi, Senda Toshiya, Sudo Yuki, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	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 The 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.jpcc.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 Yasuda Satoshi, Akiyama Tomoki, Nemoto Sayaka, Hayashi Tomohiko, Ueta Tetsuya, Kojima Keiichi, Tsukamoto Takashi, Nagatoishi Satoru, Tsumoto Kouhei, Sudo Yuki, Kinoshita Masahiro, Murata Takeshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Methodology for Further Thermostabilization of an Intrinsically Thermostable Membrane Protein Using Amino Acid Mutations with Its Original Function Being Retained	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 Murata Takeshi, Yasuda Satoshi, Hayashi Tomohiko, Kinoshita Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Theoretical identification of thermostabilizing amino acid mutations for G-protein-coupled receptors	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 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」	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	6. 最初と最後の頁 61～67
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 Yasuda Satoshi, Hayashi Tomohiko, Kajiwara Yuta, Murata Takeshi, Kinoshita Masahiro	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 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 055101～055101
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 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 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 61～66
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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuki Kazama, Satoshi Yasuda, Tomoki Akiyama, Masahiro Kinoshita, Takeshi 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 Satoshi Yasuda, Tomohiko Hayashi, Yuta Kajiwara, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita
2. 発表標題 Analyses based on statistical thermodynamics for large difference between thermophilic rhodopsin and xanthorhodopsin in terms of thermostability
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda, Yuta Kajiwara, Yuki Takamuku, Nanao Suzuki, Yosuke Toyoda, Kazushi Morimoto, Ryoji Suno, So Iwata, Takuya Kobayashi, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita
2. 発表標題 Theoretical Prediction of Thermostabilizing Mutations for GPCR: Identification of Hot-Spot Residues to be Mutated Common in Class A GPCRs
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoki Akiyama, Naoki Kunishima, Masako Hirose, Sayaka Nemoto, Satoshi Yasuda, Yuki Sudo, Takeshi Murata
2. 発表標題 Further Thermo-Stabilization of Thermophilic Rhodopsin through Engineering in Intramembrane and Extramembrane Regions
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda, Tomohiko Hayashi, Yuta Kajiwara, Takeshi Murata, and Masahiro 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 The 79th Okazaki Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda, Tomohiko Hayashi, Yuta Kajiwara, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita
2. 発表標題 Physical origin of exceptionally high thermostability of thermophilic rhodopsin
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田賢司
2. 発表標題 統計熱力学に基づいたG蛋白質共役型受容体耐熱化アミノ酸変異体の理論的予測
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安田賢司
2. 発表標題 置換により多くのClass AのGタンパク質共役型を安定化するアミノ酸残基の理論的決定
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安田賢司
2. 発表標題 サーモフィリックロドプシンの極めて高い熱安定性に対する統計熱力学的解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第43回討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda
2. 発表標題 Statistical thermodynamics for remarkably high thermal stability of thermophilic rhodopsin
3. 学会等名 The Second Symposium of Chiral Molecular Science and Technology in Chiba University -Advanced Materials Science, Biology & Nanophotonics in Chiba-
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoshi Yasuda
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0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------