

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05431

研究課題名(和文) タンパク質構造安定性における疎水性相互作用仮説の検証と共溶媒効果の理論・実験解明

研究課題名(英文) Verification of the hydrophobic interaction hypothesis in protein structural stability and theoretical/experimental study on cosolvent effects

研究代表者

墨 智成 (Sumi, Tomonari)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・准教授

研究者番号：40345955

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)：本研究では、次の二つの問題に取り組んだ。一つは水中でのタンパク質構造安定性における水和効果の解明、もう一つはトリフルオロエタノール(TFE)および尿素によるタンパク質構造安定性に対する相反する共溶媒効果の分子機序の解明である。前者では、水は疎水基を嫌っておらずむしろ疎水基を好むため、天然構造の安定性は基本的にタンパク質の分子内相互作用に起因することを明らかにした。後者では、TFEは水酸基を介して側鎖と強く静電相互作用することにより、ヘリックスへの選択的溶媒和を強めてその安定化を導き、尿素は主鎖との相互作用を介してコイルへの選択的溶媒和を強めて、その結果、コイルの安定化を誘導することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の水中での構造安定性機構では、約60年もの間、Kauzmannによる「疎水性相互作用仮説」が、中心的役割を果たしてきた。実際、生化学や分子生物学の教科書には必ず、タンパク質の構造安定性における疎水性相互作用の重要性が説かれており「疎水基に対する水からの反発力により、疎水基間に水を介した実効的引力が働く」と説明されている。本研究による結論は、長年信じられてきた疎水性相互作用仮説に対する再検討の必要性を指摘しており、新たな水和の役割、すなわち分子内相互作用により構造化されたタンパク質をむしろ不安定することにより構造の柔軟性をもたらす、機能発現に必要なゆらぎを導いていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we addressed the following two questions. One is to elucidate the hydration effect on protein folding stability in water, and the other is to elucidate the molecular mechanisms of the opposing co-solvent effects of 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) and urea on protein folding stability.

In the former, we found that water does not disfavor hydrophobic groups, but rather prefers to interact with them, and thus the stability of native protein structures is essentially due to intramolecular interactions of the proteins. In the latter, we showed that TFE strongly interacts electrostatically with side chains via hydroxy groups, leading to helix induction by enhancing preferential solvation to the helical structures, while urea enhances preferential solvation to the coil via interaction with the main chain, thereby inducing coil stabilization.

研究分野：物理化学

キーワード：タンパク質 疎水性相互作用 水和効果 分子内直接相互作用 共溶媒効果 アルコール 尿素 選択的溶媒和

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質が示す多様な物性(変性, 凝集, 溶解, 結晶化, 液-液相分離)は, 基礎科学として幅広い学術分野(化学, 構造生物学, 医学など)から強い関心を集めているだけでなく, バイオ医薬品の設計や品質管理等の応用にも関係する, 社会的に重要な研究課題である。これらの基礎となる水中でのタンパク質の天然構造安定性は, 約 60 年もの間, Kauzmann による「疎水性相互作用仮説」に基づく解釈が中心的役割を果たしてきた。実際, 生化学や分子生物学の教科書には必ず, 疎水性相互作用の重要性が説明されており「疎水基に対する水からの反発力により, 疎水基間に水を介した実効的引力が働く」と説明されている。しかしその一方で, 観測事実との矛盾が数多く指摘されているにも関わらず, その検証は容易ではないため, 仮説の妥当性に関わる厳密な検討は行われてこなかった。

(2) 尿素はタンパク質の分離・抽出において用いられ, アルコールはタンパク質中の各アミノ酸配列のヘリックス形成能の評価や, 液-液相分離の制御等に利用されている。水に加えることで効果を発揮するこれらの添加物は共溶媒と呼ばれ, 幅広く活用されてきた。両者とも, 水よりタンパク質との相互作用を好むため, タンパク質への選択的結合(溶媒和)を示す。一方, 両者の顕著な違いとして, 尿素は天然構造におけるヘリックスを壊して乱れたコイルを導くのに対し, 2, 2, 2-トリフルオロエタノール(TFE)などフッ素系アルコールは逆に, ヘリックスの安定化を導くことが, 古くより知られていた。これらのメカニズムとして, 尿素については, 水の性質の変化に伴う疎水性相互作用の変化を主要因とする「間接相互作用メカニズム」が提案されている。一方 TFE については, TFE 水溶液の顕著な濃度揺らぎによって誘導されるヘリックスを取り囲むミセル様溶媒和殻の形成に基づく分子機序が提案されている。しかしながら, これらの共溶媒効果を包括的に説明するメカニズムについて, 十分な理解には至っていない。

2. 研究の目的

(1) Kauzmann の疎水性相互作用仮説は約 60 年もの間, タンパク質構造安定性の理論として中心的役割を果たしてきた。それにも関わらず, 本仮説の理論的検証はほとんど行われてこなかった。その理由として, 構造が大きくゆらぐタンパク質に対して, 全原子分子モデルを適用して溶媒和自由エネルギーを精度良く計算するのは, 多大なる技術的困難を伴うからである。本研究の目的は, 本仮説を理論的に検証し, その問題点を明確化するとともに, タンパク質の天然構造安定性における主要因子を導き出すことである。

(2) 尿素やアルコール(TFE)によるタンパク質に対する共溶媒効果は, 長年に渡り議論・論争が続いており, 様々なメカニズムが提案されている。これらはともに水よりタンパク質を好み, タンパク質に対する選択的溶媒和を示すことが知られている。一方, 共溶媒効果としては, 尿素は天然構造に含まれるヘリックスを壊してコイルを誘導するのに対して, TFE は逆にヘリックス構造を誘導する。しかしながら, これまで個別に提案されてきたメカニズムでは, これら相反する共溶媒効果を包括的に説明・理解するには至っていない。そこで本研究では, 私どもが先行研究において TFE によるヘリックス誘導に関する実験データの分析に適用した熱力学的恒等式を用いて, 共溶媒存在下におけるタンパク質の MD シミュレーションデータを解析し, 選択的溶媒和の視点からこれら相反する共溶媒効果の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Kauzmann 仮説の理論的検証

本研究では, 明確な疎水コアを有するロイシンジッパーGCN4-p1 におけるヘリックス二量体間の疎水性相互作用を, 図 1 に示す Packing-desolvation モデルと呼ばれる熱力学サイクルを用いて解析する。その天然状態, ヘリックス二量体の構造は分子動力学(MD)シミュレーションで生成し, 得られた構造をヘリックス重心間が 2 nm 程度離れた解離させられたヘリックス単量体と比較することにより, 直接相互作用エネルギー E^{intra} および溶媒和自由エネルギー μ^{ex} の, 有効エネルギー $E^{eff} = E^{intra} + \mu^{ex}$ への寄与を分析する。タンパク質は天然状態においても, 大きな構造揺らぎを有するので, これらの定量的解析には, 長時間 MD シミュレーションから得られる構造(10 万構造)を用いた統計平均を行う。このような膨大な数の構造に対し, 高精度な μ^{ex} の計算が実行可能なのは, 我々が開発した液体の密度汎関数理論(RMDFT 法)[1]を含め, 限られた方法のみである。Kauzmann 仮説が予測するように, ヘリックス二量体が解離する際, ヘリック

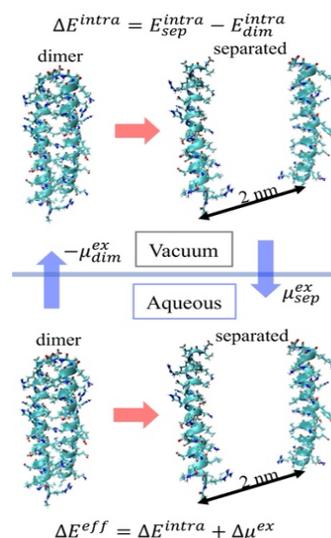


図 1 熱力学サイクルを用いたロイシンジッパーGCN4-p1 における疎水性相互作用の解析。

ス界面に存在する疎水基(ロイシン, バリン)が水に露出することにより, μ^{ex} が本当に上昇するのか(不安定化を導くのか), 定量的に検証する。

(2) Helix-coil 転移における共溶媒効果の解明

私どもの研究グループによる小角 X 線散乱(SAXS)測定により, TFE 水溶液はモル分率 0.12 辺りで, 濃度ゆらぎの顕著な極大を示すことが見出された[2]。TFE を含むフッ素系アルコールによる高いヘリックス誘導能は, その大きな濃度ゆらぎに起因した, アルコール分子のタンパク質への選択的溶媒和に起因すると考えられてきた[3]。しかしながら, SAXS による正確な濃度ゆらぎの算出から, 濃度ゆらぎが増大するより低濃度域において, TFE は十分大きなヘリックス誘導能を示すことが明らかとなった[2]。

ところで, 前述の選択的溶媒和に関する熱力学的恒等式によれば, 共溶媒の添加によってヘリックスの安定化を導く場合は, コイルよりヘリックスに対してより強い選択的溶媒和(以降, 過剰選択的溶媒和と呼ぶ)を示し, 逆にコイルの安定化を導く場合は, コイルに対して過剰選択的溶媒和を示す。このことから, TFE において低濃度域から観測される顕著なヘリックス誘導能は, TFE 水溶液が示す濃度ゆらぎの効果以外に, ヘリックスに対して過剰選択的溶媒和を示す何らかの分子機序が存在するはずである[2]。そこで本研究では, 濃度ゆらぎは小さいが十分な共溶媒効果を示す低濃度域に着目し, TFE および尿素がタンパク質に対して示す選択的溶媒和のメカニズムを明らかにすべく, (1)と同じ GCN4-p1 をモデルタンパク質として用いた MD シミュレーションを実施し, 選択的溶媒和に関する熱力学的恒等式に基づく解析を行った。

4. 研究成果

(1) Kauzmann 仮説の理論的検証

本研究において最も本質的な問い「ヘリックス二量体の解離によりヘリックス界面の疎水基が水に露出した時, μ^{ex} は本当に上昇するのか(不安定化を導くのか)」に対して答えを出すため, 水中での 1 μs の MD シミュレーションから得られた 10 万構造に対して, $\Delta\mu^{\text{ex}} = \mu^{\text{ex}}(\text{dimer}) - \mu^{\text{ex}}(\text{monomer})$ を計算した。その結果, $\Delta\mu^{\text{ex}}$ は負の値となり, 水和の寄与(溶媒誘起相互作用)は解離に有利に働くことが明らかとなった。さらにタンパク質上の全ての原子の電荷を仮想的にゼロにした, 完全な非極性分子モデルに対して $\Delta\mu^{\text{ex}}$ を計算したところ, 同様に水和は解離を促進する方向へ働くことが示された。以上から, 水は非極性基を嫌っておらず, 非極性基の水への露出をむしろ好んでいることが明らかとなった。一方 $\Delta E^{\text{eff}} = E^{\text{eff}}(\text{dimer}) - E^{\text{eff}}(\text{monomer})$ は正の値として計算され, 二量体状態が単量体状態より安定であることを示している。そしてその主な要因は, ヘリックス間に直接働く非極性相互作用, すなわち分散力に起因することが, 詳細な相互作用の解析から明らかとなった。

同様の計算手法を, 天然状態からコイル状態への構造変化におけるエネルギー解析に適用した。コイル状態は二つの孤立したコイル単量体として定義した。解析の結果, 前述のヘリックス解離と同様にコイルへの構造変化においても, $\Delta\mu^{\text{ex}}$ は安定化を示し, 非極性基による寄与がその大半を占めることが示された。また, コイル状態からの天然構造形成における主要な駆動力は, タンパク質分子内において直接働く分散力に起因することが明らかとなった。

本計算手法を, 加圧に伴うヘリックス解離の安定性解析に適用した結果, 赤外分光測定によって観測されている加圧による GCN4-p1 の α ヘリックスの安定化[4]並びに蛍光分光測定により示されている二つの孤立した α ヘリックスへの解離[5]と一致する計算結果が得られた。これらの結果は, 本手法の妥当性を示唆していると言える。

(2) Helix-coil 転移における共溶媒効果の解明

本研究では, TFE および尿素の濃度 2M における GCN4-p1 のヘリックス二量体およびコイル単量体に対する常温常圧下での 2 μs の MD シミュレーションを行い, タンパク質周りの溶媒和構造の解析およびタンパク質と共溶媒との相互作用エネルギーの分析を行った。共溶媒のタンパク質への選択的溶媒和の強さを特徴付けるパラメータは, ヘリックスおよびコイル状態に対してそれぞれ, Γ_{23}^{h} および Γ_{23}^{c} として与えられる(ここで, 2 はタンパク質, 3 は共溶媒を示す)。そして計算されたこれらのヘリックスとコイルの差, $\Delta\Gamma_{23} = \Gamma_{23}^{\text{h}} - \Gamma_{23}^{\text{c}}$ (過剰選択的溶媒和)は, TFE において正, すなわちヘリックスに対する TFE のより強い選択的溶媒和を示し, 尿素において負, すなわちコイルに対する尿素のより強い選択的溶媒和を示した。熱力学的恒等式に基づき, これらの計算結果は, TFE によるヘリックスの安定化, および尿素によるコイルの安定化を示していることが導かれ, 観測結果を再現していることが確認された。また, $\Delta\Gamma_{23}$ を構成する各項をまとめ直すことにより, 共溶媒による寄与(共溶媒項)と水による寄与(水項)に分割することが出来る。TFE および尿素による共溶媒項はそれぞれ, ヘリックスおよびコイルへの選択的溶媒和を通じてそれぞれの安定化に貢献しており, 水項はいずれの共溶媒の添加においても, コイルの安定化に貢献することが見出された。従って, 尿素変性では尿素による共溶媒項に加え水項もコイルの安定化(変性)に貢献し, 一方, TFE によるヘリックス誘導では, TFE による共溶媒項は水項の寄与を打ち消してヘリックス誘導へ転じられる程度の, 強い選択的溶媒和が必要であることが示された。また, 水項が常にコイル誘導に貢献する要因として, コイルはヘリックスより水分子が侵入できない小さな隙間が沢山存在するため, 水分子に対する排除体積はヘリックスよりコイルの方が常に大きくなることに起因すると考えられる。

上述の議論からも分かるように、TFE および尿素による共溶媒効果のメカニズムは、熱力学的恒等式により ΔG_{23} の正負を決める因子に帰着する。これをタンパク質と共溶媒分子との間の直接相互作用に着目して分析した。その結果、尿素変性については、コイル構造の主鎖と尿素分子との直接相互作用が、 α ヘリックス構造の時より強いため ΔG_{23} が負の値となり、尿素添加においてコイル構造が誘導されることを見出された。また、TFE によるヘリックス誘導については、TFE と α ヘリックス構造の側鎖との静電相互作用がコイル構造の側鎖より強いため、 ΔG_{23} が正の値となり、TFE 添加において α ヘリックス構造が誘導されることが明らかとなった。これまで TFE は疎水性的な CF_3 基がヘリックス方向へ向いたミセル様配向を形成すると考えられてきた。しかしながら実際には、水酸基をヘリックス側へ向けた「逆ミセル様配向」により、側鎖との静電相互作用を強めていることが示された。

以上をまとめると、尿素と TFE の共溶媒効果の違いは、共溶媒分子の化学的性質に応じたタンパク質との直接的相互作用の違いに起因することが見出された。また本研究により、タンパク質の構造変化に対する共溶媒効果は、ある特定の構造に相互作用して構造変化を誘導する直接的相互作用の効果と、水和による変性誘導効果との和として与えられることが明らかとなった。

【参考論文】

- [1] T. Sumi *et al.*, *J. Compt. Chem.* 2015, **36**, 1359.
- [2] H. Ohgi *et al.*, *PCCP*, 2021, **23**, 5760.
- [3] D. P. Hong *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8427.
- [4] H. Imamura *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1804**, 193.
- [5] M. C. Suarez *et al.*, *Biochemistry*, 2001, **40**, 1300.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 墨智成	4. 巻 75
2. 論文標題 タンパク質構造安定性機序の新たな理解～水は疎水基を嫌っていなかった～	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と工業	6. 最初と最後の頁 803～803
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 墨智成, 今村比呂志	4. 巻 55
2. 論文標題 タンパク質は疎水効果で安定化しているのか？	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」3月号	6. 最初と最後の頁 162～165
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 墨智成, 今村比呂志	4. 巻 7
2. 論文標題 タンパク質は疎水効果で安定化しているのか	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「アグリバイオ」4月号（月刊「細胞」 Vol. 55, 162～165からの転載）	6. 最初と最後の頁 372～377
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 Sumi Tomonari, Imamura Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Water mediated interactions destabilize proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 2132～2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohgi Hiroyo, Imamura Hiroshi, Sumi Tomonari, Nishikawa Keiko, Koga Yoshikata, Westh Peter, Morita Takeshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Two different regimes in alcohol-induced coil?helix transition: effects of 2,2,2-trifluoroethanol on proteins being either independent of or enhanced by solvent structural fluctuations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 5760 ~ 5772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP05103A	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 Nakata Noa, Okamoto Ryuichi, Sumi Tomonari, Koga Kenichiro, Morita Takeshi, Imamura Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Molecular mechanism of the common and opposing cosolvent effects of fluorinated alcohol and urea on a coiled coil protein	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4763-e4763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 墨 智成
2. 発表標題 最近の研究から「タンパク質安定性, 分子モーター, 薬剤送達ミセル」
3. 学会等名 CMMMフォーラム34期 2021年6月4日 (オンライン開催) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Sumi and H. Imamura
2. 発表標題 Liquid-state density functional study on energetics of protein folding stability
3. 学会等名 PACIFICHEM 2021, Solvation and Binding to Biomolecules, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田乃愛, 岡本隆一, 墨智成, 甲賀研一郎
2. 発表標題 2,2,2-トリフルオロエタノールによるGCN4-p1 コイルドコイルヘリックスの安定化の解析
3. 学会等名 第35回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Sumi and H. Imamura
2. 発表標題 Dominant factor in thermodynamic stability of protein
3. 学会等名 Symposium “Biofunctional Science of the Structural Fluctuations of Biomolecules and Drugs” The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Online) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonari Sumi
2. 発表標題 Water-mediated interaction destabilizes protein
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry Bali, 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 墨智成
2. 発表標題 共溶媒溶液の小角散乱データを用いたタンパク質構造への共溶媒効果の解析
3. 学会等名 PF研究会「物質・生命研究における小角散乱法の展開：現状と展望のための討論会」(招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 墨智成, 今村比呂志 (担当: 共著, 範囲: タンパク質構造安定性における疎水性相互作用仮説の検証 (第4章第8節))	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 タンパク質の構造解析手法とIn silicoスクリーニングへの応用事例	

〔産業財産権〕

〔その他〕

水はタンパク質の立体構造を不安定化する -長年信じられてきたタンパク質変性メカニズムの見直しへ- https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id874.html Restructuring biology: New study shows protein hydrophobic parts do not hate water https://www.eurekalert.org/news-releases/930252 タンパク質と水と共溶媒の「三角関係」を解く方法を考案 https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id1142.html Modulation of protein stability: a new approach to studying cosolvent effects https://www.eurekalert.org/news-releases/1005242

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