

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300110

研究課題名（和文）アミノ酸配列からタンパク質溶解度を計算する高精度計算システムの開発

研究課題名（英文）Development of a novel amino acid solubility propensity scale for the calculation of polypeptide solubility

研究代表者

黒田 裕 (KURODA YUTAKA)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10312240

研究成果の概要（和文）：ペプチドやタンパク質の溶解度は、構成アミノ酸の親水性・疎水性で決まるというのが定説であるが、本来このモデルは、分子の溶解度を計算するための理論ではない。本計画では、ペプチドの溶解度をアミノ酸配列から計算するために必要な、全 20 種類のアミノ酸のうち代表となる 10 種類のアミノ酸の溶解傾向性（「会合自由エネルギー」、 (ΔG_{Aggr}) ）を実験的に測定した。その結果、会合自由エネルギーの加算性を仮定することで、任意のアミノ酸配列からなるペプチド・タンパク質の溶解度を計算するシステムを開発した。今後は、未測定のアミノ酸の会合自由エネルギーを広い条件下で測定することで、ペプチドの溶解度をより正確に計算可能にする。

研究成果の概要（英文）：Protein solubility is usually characterized in terms of a hydrophobicity scale, which refers to the free energy of transfer of a molecule from an aqueous to a nonpolar solution and is not a “solubility propensity scale” *per se*. Here, we measured the effects of short poly-amino-acid tags (guests) on the solubility of a host protein, a simplified bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), to which they were fused at the C-terminus. We analyzed 10 amino acid types, representing the full range of biophysical properties (acidic, basic, polar, and hydrophobic). As anticipated, positively charged residues significantly increased the solubility of the model protein, at both pH 4.7 and 8.7, whereas very hydrophobic poly-Ile markedly reduced the solubility of BPTI. Furthermore, to ensure that the measured solubility values were context independent and could provide a genuine “solubility propensity scale”, we confirmed that the tags remained independent of the structure, thermal stability, and biochemical activity of the host protein. These observations suggest that this approach is valuable for measuring the solubility propensities of amino acids, which could eventually allow the calculation of a polypeptide’s relative solubility from its amino acid sequence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：タンパク質凝集、会合自由エネルギー、溶解度測定、溶解度向上タグ、熱力学、単純化タンパク質、ホスト・ゲスト法

1. 研究開始当初の背景

凝集は、分子の濃度が溶解限界濃度（以下、溶解度）以上になると起きる現象であり、タンパク質やペプチドの産業利用においてもしばしば問題となる。この問題に対して、ペプチドやタンパク質の溶解度は、構成アミノ酸の親水性・疎水性で決まるというのが定説であるが、本来このモデルは、分子の溶解度を計算するための理論ではない。そのため、国内外で開発されているペプチド・タンパク質の溶解度計算法は、親水性・疎水性モデルに基づいて溶解度を「予測」する手法であり、「計算」する手法ではない。よって、既存の溶解度予測法の精度は低く、溶媒条件を計算に取り入れることもできないため、予測システムとしてもあまり普及していない。

2. 研究の目的

本計画では、ペプチド・タンパク質を発現・合成する前に、その溶解度をアミノ酸配列から正確に計算する画期的な計算システムの開発を目的とする。本計算システムは、現在までの研究で開発した凝集の熱力学理論（H16・17年度特定領域研究、H18年度JSTシーズ発掘試験）に基づく、精度と汎用性の高い計算システムである。本計算システムを開発するに当たって、以下の工程を実施する：(I) タンパク質の溶解度をアミノ酸配列から計算するために必要となる各アミノ酸の溶解傾向性（「会合自由エネルギー」、 ΔG_{Aggr} ）を、変異ペプチドの溶解度から実験的に測定する。(II) 会合自由エネルギーの加算性を仮定し、任意のアミノ酸配列の溶解度を計算するシステムを構築する。(III) pH や塩濃度などの溶媒条件に対する会合自由エネルギーの依存性を測定することで、広い溶媒条件下での溶解度計算を可能にする。本溶解度計算システムの精度は高く、ペプチド・タンパク質の溶解度及び凝集が問題となる全ての研究開発分野に貢献できると期待される。

3. 研究の方法

本溶解度計算の原理は、全 20 種類のアミノ酸の会合自由エネルギーを実験的に測定し、その加算性を仮定することで、任意のアミノ酸配列からなるペプチド・タンパク質の溶解度を正確に計算できることに基づく。会合自由エネルギーの測定を可能にしたのは、研究代表者が先行研究で、分子会合モデル（アクチンタンパク質の会合体形成の熱力学モデル；Oosawa & Kasai, *J. Mol. Biol.* (1962)）

を凝集の解析に応用すると、分子の溶解傾向性と会合自由エネルギーが $\Delta G_{\text{Aggr}} = RT \ln$ （溶解傾向性）で関係付けられることを明らかにしたことによる。また、アミノ酸の溶解傾向性は、「基準ペプチド」にそのアミノ酸を特定の個数付加した変異体の溶解度を測定し、基準ペプチドと変異体ペプチドの溶解度差から決定する（詳細は H21・22 年度実績報告書参照）。

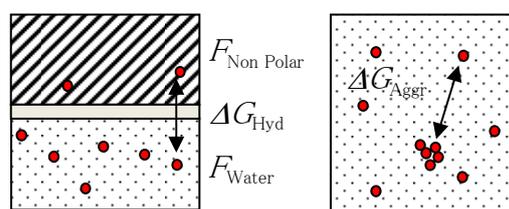


図 1A

図 1B

図 1: 親水性・疎水性モデル及び凝集の熱力学モデルの模式図。●はタンパク質分子、は非極性溶液、は水溶液を示す。1A: 親水性・疎水性モデルの模式図。このモデルで求められる自由エネルギー (ΔG_{Hyd}) は、非極性溶液 (F_{NonPolar}) と水溶液 (F_{Water}) の分子の分配係数を表す。1B: 本計画で用いるタンパク質の凝集の「正しい」熱力学モデルの模式図。会合の自由エネルギー (ΔG_{Aggr}) は、タンパク質会合体へ 1 タンパク質分子を付加することに伴う自由エネルギーの変化である。

4. 研究成果

本研究で、Arg、Ile、Lys、Ser、Asp、Asn、Gln、Glu、Pro、His の 10 種類のアミノ酸の会合自由エネルギーを測定し、ペプチド溶解度の計算を可能にした（図 2）。現在、未測定のアミノ酸の会合エネルギーの値には、化学構造が類似したアミノ酸の値を用いて代行している。さらに、溶解度を pH4.7 と 8.7 の 2 つの pH で測定したことで、pH 依存性を溶解度計算に取り入れることを初めて可能にした。従来の親水性・疎水性モデルでは pH 依存性は考慮されていない。さらに、該当アミノ酸を付加した変異体 BPTI タンパク質の X 線結晶構造解析も行い、7 つの構造を PDB に登録した（3AUB、3AUC、3AUD、3AUE、3AUG、3AUH と 3AUI、図 3）。以上、本計画を実施するこ

とによって、任意のアミノ酸配列からなるペプチドの溶解度を pH 依存的に予測することが可能となった。今後は、未測定のアミノ酸の会合自由エネルギーを広い条件下で測定することで、ペプチドの溶解度をより正確に計算可能にする。

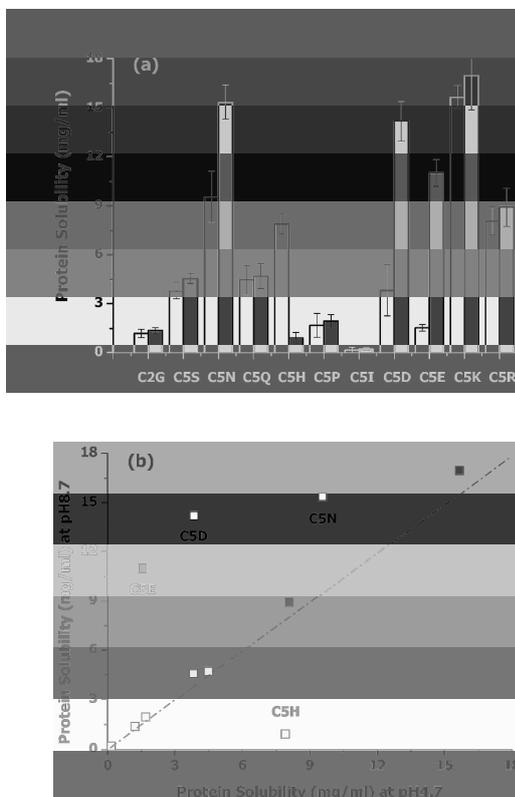


図 2: アミノ酸の溶解傾向性。(a)溶解傾向性は、該当アミノ酸を 5 個付加した基準ペプチドの溶解度と基準ペプチドの溶解度から算出する。ここでは C2G が基準ペプチドである。pH4.7 と 8.7 の溶解傾向性をそれぞれ白と灰で示す。(b) pH4.7 と 8.7 の溶解傾向性の相関図。アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンとヒスチジンの溶解傾向性の pH 依存性が特に大きかった。

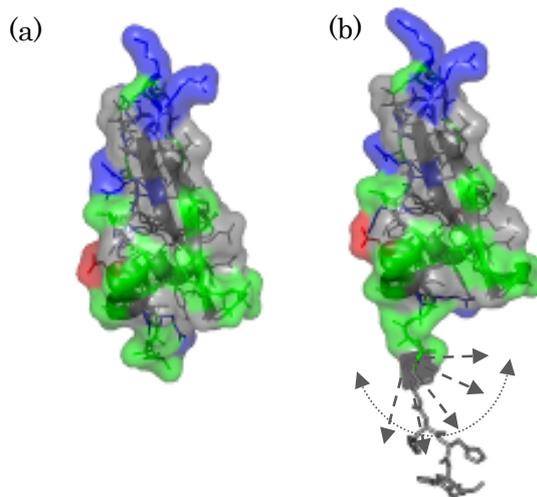


図 3: 基準ペプチドに用いた単純化 BPTI の X 線結晶構造。(a) タグを付加していない基準ペプチドと (b) His₅ タグを付加したペプチド変異体。付加したタグは基準ペプチド本体の構造に全く影響しておらず、タグと本体が構造的・機能的に独立していることが示された。以上のことから本計画で測定した溶解傾向性が、基準ペプチドに依存しない普遍的な値である可能性が高いことが示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① Islam M M, Khan M M A, Kuroda Y, Analysis of amino acid contributions to protein solubility using short peptide tags fused to a simplified BPTI variant, *BBA (Proteins and Proteomics)*, 査読有, in press
- ② Rathnayaka T, Tawa M, Nakamura T, Sohya S, Kuwajima K, Yohda M, Kuroda Y, Solubilization and folding of a fully active recombinant *Gaussia* luciferase with native disulfide bonds by using a SEP-tag, *Biochim Biophys Acta. Proteins and Proteomics*, 査読有, 1814(12), 2011, 1775-1778, DOI:10.1016/j.bbapap.2011.09.001
- ③ Totsukawa G, Kaneko Y, Uchiyama K, Toh H, Kondo H, VCIP135 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97 ATPase-mediated membrane fusion, *EMBO J*, 査読有, 30(17), 2011, 3581-3593,

- DOI: 10.1038/emboj.2011.260
- ④ Ebina T, Toh H, Kuroda Y, DROP: an SVM domain linker predictor trained with optimal features selected by random forest, *Bioinformatics*, 査読有, 27(4), 2011, 487-494, DOI: 10.1093/bioinformatics/btq700
- ⑤ Totsukawa G, Kaneko Y, Uchiyama K, Toh H, Kondo H, VCIPI35 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97 ATPase-mediated membrane fusion, *EMBO J*, 査読有, 30(17), 2011, 3581-3593, DOI: 10.1038/emboj.2011.260
- ⑥ Hirose S, Yokota K, Kuroda Y, Wako H, Endo S, Kanai S, Noguchi T, Prediction of protein motions from amino acid sequence and its application to protein-protein interaction, *BMC Structural Biology*, 査読有, 10, 2010, 20, DOI:10.1186/1472-6807-10-20
- ⑦ Rathnayaka T, Tawa M, Sohya S, Yohda M, Kuroda Y, Biophysical characterization of highly active recombinant Gaussia luciferase expressed in Escherichia coli, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1804(9), 2010, 1902-1907, DOI:10.1016/j.bbapap.2010.04.014
- ⑧ Johansson F, Toh H, Relative von Neumann entropy for evaluating amino acid conservation, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 査読有, 8(5), 2010, 809-823, DOI: 10.1142/S021972001000494X
- ⑨ Johansson F, Toh H, A comparative study of conservation and variation scores, *BMC Bioinformatics*, 査読有, 11, 2010, 388, DOI:10.1186/1471-2105-11-388
- ⑩ Chikayama E, Kurotani A, Tanaka T, Yabuki T, Miyazaki S, Yokoyama S, Kuroda Y, Mathematical Model for Empirically Optimizing Large Scale Production of Soluble Protein Domains, *BMC Bioinformatics*, 査読有, 11, 2010-113, DOI:10.1186/1471-2105-11-113
- ⑪ Islam MM, Sohya S, Noguchi K, Kidokoro S, Yohda M, Kuroda Y, Thermodynamic and structural analysis of highly stabilizing single and double mutations in BPTI variants, *PROTEINS*, 査読有, 77, 2009, 962-970, DOI:10.1002/prot.22522
- ⑫ Kamioka T, Tawa M, Sohya S, Yamazaki T, Kuroda Y, Improved protein splicing reaction for low solubility protein fragments without insertion of native extein residues (NERs), *Biopolymers (Peptide Science)*, 査読有, 92 (5), 2009, 465-470, DOI:10.1002/bip.21261
- ⑬ Iwatsuki M, Mimori K, Sato T, Toh H, Yokobori T, Tanaka F, Ishikawa K, Baba H, Mori M, Overexpression of SUGT1 in human colorectal cancer and its clinicopathological significance, *Int J Oncol*, 査読有, 36, 2010, 569-575, DOI: 10.3892/ijo_00000531
- ⑭ Nemoto W, Toh H, GRIP: A server for predicting interfaces for GPCR oligomerization, *J. Receptors and Signal Transduction*, 査読有, 29, 2009, 312-317, DOI:10.3109/10799890903295143
- ⑮ Shimizu K, Toh H, Interactions between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network, *J. Mol. Biol.*, 査読有, 392, 2009, 1253-1265, DOI:10.1016/j.jmb.2009.07.088
- ⑯ Ebina T, Toh H, Kuroda Y, Loop-length dependent SVM prediction of domain linkers for high-throughput structural proteomics, *Biopolymers*, 査読有, 92, 2009, 1-8, DOI:10.1002/bip.21105

[学会発表] (計 57 件)

- ① Mohammed M A Khan, Mohammad M Islam, Yutaka Kuroda, Contribution of individual amino acids to protein solubility using amino acid tag, 生物物理関東地区研究会, 2012年3月6日, 東京農工大学(東京都)
- ② Mohammad M Islam, Yutaka Kuroda, Effects of short solubility controlling peptide tags on protein's solubility, thermodynamics, structure and function, Conference of the Bangladesh Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2012年2月25,26日, University of Rajshahi (Rajshahi, Bangladesh)
- ③ Mohammad M. Islam, Yutaka Kuroda, Host Guest Analysis of Amino Acids contribution to Protein Solubility Using Short SET-Tags Fused to a Simplified BPTI, 揺らぎが機能を定める生命分子の科学第5回公開シンポジウム(招待講演), 2012年1月7日, 東大寺文化センター(奈良県)
- ④ Jean-Baptiste Rouget, Mariano Dellarole, Kei Kobayashi, Julien Roche, Yutaka Kuroda, Catherine A. Royer, Understanding protein native

expansivity by mutants affecting cavities, surface and order, 6th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP2011), 2011年12月13日大津市市民会館(滋賀県)

- ⑤ 黒田裕, 加藤淳, Mohammad Islam, Amino Acids Contribution to Polypeptides Solubility Analyzed Using Short Poly-Amino Acid Tags, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク(大阪府)
- ⑥ Mohammad M Islam, Atsushi Kato, Shihori Sohya, Mohammed Khan, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Shun-ichi Kidokoro, Yutaka Kuroda, Effects of short solubility controlling peptide tags on protein solubility, thermodynamics, structure and function, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク(大阪府)
- ⑦ Mohammad M Islam, Shihori Sohya, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Yutaka Kuroda, X-Ray Crystal Structures of Extensively Simplified BPTI Variants Determined Using the KEK Photon Factory Facility, First Asia-Europe Physics Summit, 2010年3月24日, エポカルつくば(茨城県)

[図書] (計2件)

- ① 朽津耕三、黒田裕、志田忠正、日本化学会 グリーンブック要約版・訳書作成委員会、邦訳:「物理化学で用いられる量・単位・記号 要約版、2010、11
- ② 日本化学会監修、産業技術総合研究計量標準総合センター訳、IUPAC 著、講談社サイエンティフィック、IUPAC 物理化学で用いられる量・単位・記号第3版、2009、234

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ① 名称: 発現予測装置および発現予測方法
発明者: 廣瀬修一、野口保、五島直樹、河村義史、黒田裕
権利者: 産業技術総合研究所、バイオ産業情報化コンソーシアム、東京農工大学
種類: 特許
番号: 特願2009-290490
出願年月日: 2009年12月22日
国内外の別: 国内・国外
- ② 名称: 可溶性予測装置および可溶性予測方法
発明者: 廣瀬修一、野口保、五島直樹、河村義史、黒田裕
権利者: 産業技術総合研究所、バイオ産

業情報化コンソーシアム、東京農工大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-290519
出願年月日: 2009年12月22日
国内外の別: 国内・国外

[その他]

- ① The first prize for the poster (Best poster 賞)受賞
Mohammad Monirul Islam, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Kuroda Yutaka, "Effect of short peptide tags on protein solubility, function, and structure" Symposium on the Role of Biochemists in Health and Environment, Dhaka, Bangladesh, May 21, 2010
- ② X線結晶構造解析は Photon factory (高エネルギー加速研究機構、KEK) で実施した(2011G108)。
- ③ ホームページ
<http://www.tuat.ac.jp/~ykuroda>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 裕 (KURODA YUTAKA)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 10312240

(2) 研究分担者

藤 博幸 (TOH HIROYUKI)
産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・副研究センター長
研究者番号: 70192656

(3) 連携研究者

なし