

## 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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570166

研究課題名（和文） 100度以上の高温での蛋白質変性の熱力学

研究課題名（英文） Thermodynamics of protein denaturation at high temperatures more than 100°C

研究代表者

油谷 克英 (YUTANI KATSUHIDE)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・上級研究員

研究者番号：90089889

研究成果の概要（和文）：

変性温度が 70 - 80 °C 以上の高い温度での蛋白質熱安定化の機構は推定でしかなかった。その主な原因は、100 °C 近くに変性温度を持つ蛋白質の熱変性が不可逆で熱力学研究を妨げていたからである。本研究課題で、大腸菌由来 CutA1 の SH 基を含まない変異型と、これを鋳型とした疎水性変異型 S11V、E61V、S11V/E61V などが、高い熱変性温度(90-115°C)を維持して、熱変性の高い可逆性を示すことを見出し、それらの熱力学的パラメータを実験的に求めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The heat-denaturation of proteins is usually irreversible at higher temperatures than around 70 °C, because of aggregation after heat denaturation. Therefore, their thermodynamic characteristics are less well understood at the temperatures more than 70 °C. In this study, we found that SH-free CutA1 mutant from *E. coli* and its hydrophobic mutants show very good reversibility of heat denaturation at pH 9. The denaturation temperatures of the hydrophobic mutants were 90-115 °C. Then, we succeeded to experimentally obtain the thermodynamic parameters of protein denaturation over 100 °C by DSC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質変性の熱力学、蛋白質の安定性、蛋白質熱変性の可逆性、示差走査熱量計、超好熱菌由来蛋白質、疎水性相互作用、イオン相互作用、CutA1

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の一つの重要な安定化因子、疎水性相互作用の熱力学的パラメータの温度依

存特性は、比較的多くの知見が蓄積されている。しかし、それらは 80°C 以下での知見であり、それ以上の温度では、低分子のモデル物

質を用いた研究はあるが、蛋白質を対象とした系統的な研究が進んでいない。最近、超好熱菌由来の蛋白質を用いた基礎研究ならびに応用研究は盛んに行われるようになったが物理化学的な研究、特に熱安定化機構の研究が遅れている。熱力学的研究が遅れている原因は、超好熱菌由来の蛋白質の熱変性が不可逆なために、平衡系での熱力学的解析を困難にしているところにある。また、超好熱菌蛋白質は一般にイオン性残基含量が多いが、高温でのイオン性相互作用による熱安定化の効用は相反する議論があって、その安定化の機構は確立していない。

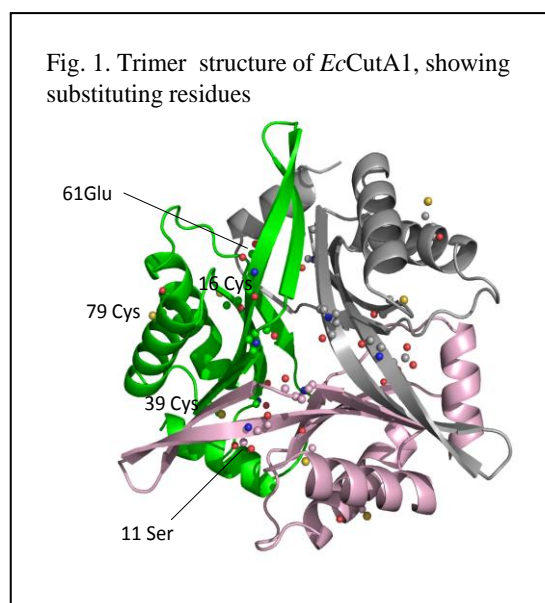
## 2. 研究の目的

「100°C以上の高温での蛋白質変性の熱力学」、特に100°C以上での蛋白質の疎水性相互作用と静電的相互作用の熱力学的パラメータを実験的に求めることを目的としている。

## 3. 研究の方法

私たちはこれまでに超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の CutA1 蛋白質 (*PhCutA1*) の熱変性温度が 150°C であることを見出している。大腸菌由来の CutA1 (*EcCutA1*) の変性温度は約 90°C である。本研究では、*PhCutA1* の構造を模倣して、*EcCutA1* に疎水性残基、イオン性残基をアミノ酸置換の手法で導入して、100°C 近くまたはそれ以上での熱安定性を有する変異型を作成する。そして、疎水性、イオン性相互作用の追加に伴う熱力学的特性の変化を、示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry; DSC) 測定によって求める。DSC 装置は VP-capillary DSC platform (MicroCal, USA) を用いた。

Fig.1 に示すように *EcCutA1* は 3 量体構造で、一つのサブユニットが他の二つのサブユニットと絡み合うように、βシートを互いに共有している。図には、今回置換を行った

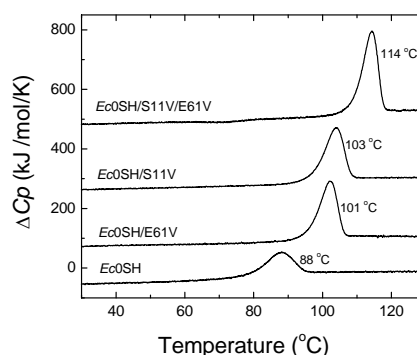


11 Ser, 61 Glu と 3 つの Cys 残基 16 Cys, 39 Cys, 79 Cys の位置をそれぞれ示している。本研究では、熱変性の可逆的な試料を得る目的として、3 つの Cys 残基を全て Ala に置換した *EcCutA1\_0SH* 変異型を作製した。

## 4. 研究成果

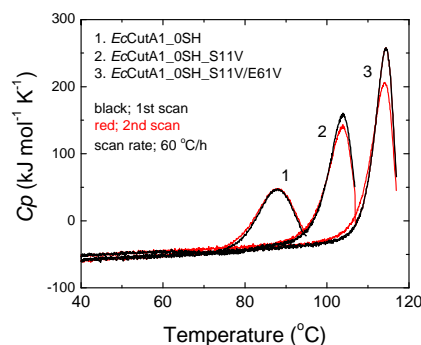
*EcOSH* の疎水性変異型、*EcOSH/S11V*、*EcOSH/E61V*、*EcOSH/S11V/E61V* の DSC 曲線を Fig2 示すように、鋳型変異型 (*EcOSH*) の変

Fig. 2. DSC curves of hydrophobic mutants of *EcCutA1\_0SH* at pH 9



性温度は 88°C、他はそれぞれ 101、103、114°C で、一残基置換で顕著な安定性の変化を示した。また、Fig3 に示すように pH9 において、*EcOSH* は大変良好な可逆性を示し、*EcOSH/S11V*、*EcOSH/S11V/E61V* 変異型もま

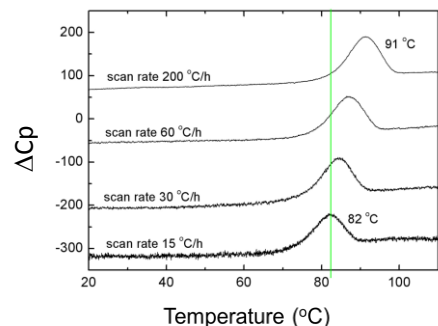
Fig. 3. Reversible RSA curves of *EcCutA1* mutants at pH 9



た良好な可逆性を示した。Fig3 の黒色のカーブは DSC 測定における最初のスキャンで、そのスキャンが終了後、冷却後同じセル内での第二のスキャンが赤色のカーブで示されている。100°C 近くの変性温度 (Td) にかかわらず、このように高い熱変性の可逆性を示す DSC の測定例はこれまでにないと思われる。可逆性は、高温での熱変性の熱力学的パラメータ精度を保証している。

個々の変異型に関して、変性のエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) の温度関数を求めるために、種々の昇温速度 (scan rate) で DSC を行った結果を Fig4 に示す。図の緑色の縦線は 15 °C

Fig. 4. Scan rate dependence of DSC curves of *EcCutA1\_0SH* at pH 9.



/h の昇温速度における DSC 曲線のピーク位置を示している。このことは昇温速度 30 °C/h においても昇温中の熱変性は平衡には達していないこと、つまり、熱変性速度が非常に遅いことを示している。15 °C/h と 200 °C/h での変性のピーク温度はそれぞれ 82、91 °C で、10 °C 近くの差がある。このことは、昇温速度の異なる測定から  $\Delta H$  の Td 依存性 (変性の熱容量変化、 $\Delta Cp$ ) を求めることができることを示す。これまでは異なる pH の  $\Delta H$  変化から  $\Delta Cp$  を求められていたが、本結果は、同一 pH でも、Td に昇温速度依存性があれば、このように  $\Delta Cp$  を求めることができることを示した最初の例である。

Fig. 5. Relationship between Denaturation enthalpy and denaturation temperature of hydrophobic *EcCutA1* mutants

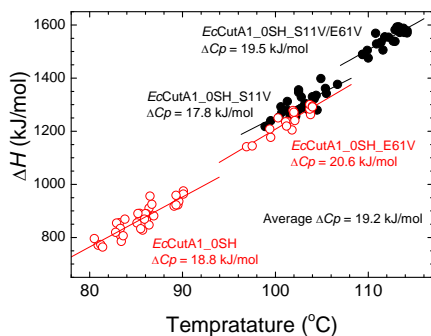
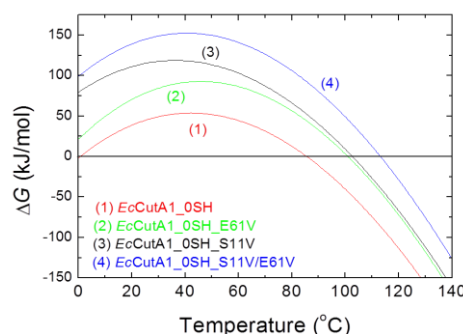


Fig5 は *EcOSH* とそれを用いた S11V, E61V, S11V/E61V 変異型に関して、種々の昇温速度で測定したデータをプロットしたものである。 $\Delta H$  と Td の勾配から求めた  $\Delta Cp$  は図中と Table 1 に記している。得られた  $\Delta Cp$  の誤差から評価すると、4 種のタンパク

質の間で、 $\Delta Cp$  に有意の差異が認められないので、未知の場合、OSH 変異型の  $\Delta Cp$  として平均値の 19.2 kJ/mol/°C を仮定して使用できる。

Fig6 のカーブを得るために、実験的に得られた *EcCutA1\_0SH* 変異型の熱力学的パラメータ (Table 1) を用いた。*EcOSH* 二重変異型は 0 °C 以上の全温度範囲で、他の変異型に比べ高い安定性を示すことが分かる。また、二重変異型 (*EcOSH\_S11V/E61V*) は、個々の一残基置換変異型 (*EcOSH\_S11V*, *EcOSH\_E61V*) の安定性を加算したような結果を示している。100 °C での鋳型、*EcCutA1\_0SH* の  $\Delta G$  は -40 kJ/mol (既に変性している) で、各変異型の  $\Delta \Delta G$  は Table 1 に示すとおりである。これらのデータから次のことが推測できる。各変異型の  $\Delta G$  (安定性) の増加は  $\Delta H$  の増分でまかなっていると言える。それは、 $T\Delta S$  が正の値を示しているからである ( $\Delta G = \Delta H$

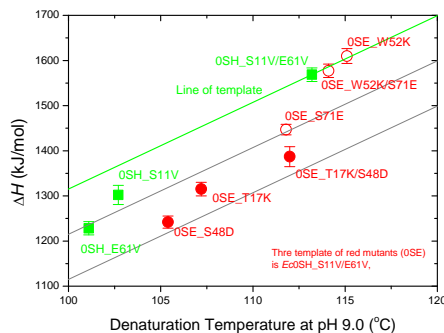
Fig. 6. Temperature functions of unfolding Gibbs energy for hydrophobic *EcCutA1\_0SH* mutant proteins at pH 9.



- $T\Delta S$ )。結果的には、 $\Delta H$  の一部は  $\Delta S$  によって相殺されている。

次に、*EcCutA1\_0SE* を鋳型にして荷電残基を導入した変異型の結果を示す (Fig. 7)。

Fig. 7. Relationship between denaturation enthalpy and denaturation temperature of ion mutants



緑色のラインは *EcCutA1\_OSE* の昇温速度 60°C/h での平均の $\Delta H$  値と変異型 4 種の平均の $\Delta C_p$  値(19.2kJ/mol°C)を用いて作成されたものである。各変異型の全データを用いて 60°C/h での平均値として求めた熱力学的パラメータを Table2 と Fig7 に示す。T17K/S48D 二重変異型の変性温度( $T_d$ )は 112.0°Cで、個々の変異型 T17K( $T_d=107.2$  °C)、S48D ( $T_d=105.4$ °C)に比べ置換した残基間の相互作用によって熱安定化していることを示した。二重変異型の変性の $\Delta H$  は鑄型の $\Delta C_p$  に比例して高くなっていたので、この相互作用はエントロピー効果によることを明瞭に示唆した。しかし、A33K/S71E ( $T_d=113.0$ °C)、W52K/S71E ( $T_d=114.3$ °C)と A33E/S110K ( $T_d=113.1$ °C)は T17K/S48D の結果に比べ、複雑な熱力学的パラメータの変化を示した。そこで、最初からの計画でもあったが、更に系統的で網羅的な変異型に関する熱力学的研究を進めその解析も進行中である。しかしながら、本研究で、イオン相互作用がエントロピー効果で安定化していることを実験的に示せたのは貴重な結果だと思える。

まとめ

大腸菌由来の CutA1 変異型、SH 基を含まない疎水性残基及び荷電性残基置換型は、変性温度が 100°C 以上で、熱変性が良好な可逆性を示し、熱変性の熱力学的パラメータを精度高く求めることができた。10 種の変異型の $\Delta H$  の誤差は 1.0-2.4%の範囲で、その平均は 1.3%であった。特徴的な変異型のデータは 100°C 付近の疎水性相互作用と静電的相互作用はそれぞれエンタルピー効果とエントロピー効果に起因することを示唆した。本研究は、更なる CutA1 変異型タンパク質で、これらのデータを検証することによって、これまで推定でしかなかった 100°C 以上でのタンパク質変性の熱力学を実証的に明らかにできることを示している。

Table 1. Thermodynamic parameters of denaturation for several hydrophobic mutants at pH9.0

Proteins	$T_d$ (°C)	$\Delta H$ at $T_d$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta C_p$ (kJ mol <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta H$	$T\Delta\Delta S$	$\Delta\Delta G$
				at 100 °C	at 100 °C	at 100 °C
				(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )
<i>EcCutA1_0SH</i>	85.6±0.3	870±21	18.8±1.6	0	0	0
<i>0SH_S11V</i>	102.7±0.3	1302±21	17.8±3.0	113	64	49
<i>0SH_E61V</i>	101.0±0.2	1228±15	20.6±2.2	66	23	43
<i>0SH_S11V/E61V</i>	113.2±0.2	1569±15	19.5±2.9	188	102	86

Table 2. Thermodynamic parameters of denaturation for several ionic mutants at pH 9.0

Proteins	$T_d$ (°C)	$\Delta H$ at $T_d$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta H$	$T\Delta\Delta S$	$\Delta\Delta G$
			at 100 °C	at 100 °C	at 100 °C
			(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )	(kJ mol <sup>-1</sup> )
<i>0SE_S48D</i>	105.4±0.2	1242±14	1138	1121	0
<i>0SE_T17K</i>	107.2±0.3	1315±15	1177	1153	24
<i>0SE_T17K/S48D</i>	112.0±0.1	1387±22	1157	1117	40
<i>0SE_S71E</i>	111.8±0.1	1447±12	1220	1179	41
<i>0SE_W52K</i>	115.1±0.1	1610±16	1320	1283	57
<i>0SE_S71E/W52K</i>	114.1±0.0	1577±15	1306	1254	52

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件、すべて査読あり)

- ① Effect of heavy atoms on the thermal stability of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae*. Michihiro Sugahara, et al., Katsuhide Yutani. *PLOS One*, **8**, e57432, 1-7 (2013)
- ② Structure and function of a TetR family transcriptional regulator, SbtR, from *Thermus thermophilus* HB8. Yoshihiro Agari, et al., Katsuhide Yutani, *Proteins*, (2013) in press
- ③ Role of charged residues in stabilization of *Pyrococcus horikoshii* CutA1, which has a denaturation temperature of nearly 150°C. Yoshinori Matsuura, et al., Katsuhide Yutani *FEBS Journal*, **279**, 78-90 (2012)
- ④ Structural Characterization of a Trapped Folding Intermediate of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile. Mineyuki Mizuguchi, et al., Katsuhide Yutani. *Biochemistry*, **51**, 6089-6096 (2012)
- ⑤ A Demetallation Method for IMP-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase with Restored Enzymatic Activity Upon Addition of Metal Ion(s). Yoshihiro Yamaguchi, et al., Katsuhide Yutani, *ChemBioChem*, **12**, 1979 - 1983 (2011)
- ⑥ Crystal structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: implications for thermal stability. Bagautdin Bagautdinov and Katsuhide Yutani *Acta Crystallographica Section D*. **D67**, 1054-1064 (2011)
- ⑦ The catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) of the class A  $\beta$ -lactamase Toho-1 correlates with the thermal stability of its catalytic intermediate analog. Yasushi Nitani, et al., Katsuhide Yutani, *Biochem. Biophys. Acta*. **1804**, 684-691(2010)
- ⑧ Large conformational changes in *Escherichia coli* tryptophan synthase  $\beta_2$  Subunit upon binding of PLP. Kazuya Nishio, et al., Katsuhide Yutani, *FEBS J.*, **227**, 2157-2170 (2010)
- ⑨ Crystal structure of TTHA0061, an uncharacterized protein from *Thermus thermophilus* HB8, reveals a novel fold. Tomoyuki Tanaka, et al., Katsuhide Yutani, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **400**,:258-264 (2010)
- ⑩ Construction of robust bio-nanotubes using the controlled self-assembly of component proteins of bacteriophage T4. Norihiko Yokoi, et al., Katsuhide Yutani, *Small*. **6**, 1873-1879 (2010).
- ⑪ Remarkable improvement in the heat

stability of CutA1 from *Escherichia coli* by rational protein design. Yoshinori Matsuura, et al., Katsuhide Yutani *J. Biochem.* **148**, 449-458 (2010)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yoshinori Matsuura, et al., Katsuhide Yutani, Heat-stabilization strategy due to unusual amount of charged residues in CutA1 protein from hyperthermophile, which has a denaturation temperature of nearly 150 °C. 9th International Conference on Protein Stabilization, 2012-5-3, Lisbon, Portugal
- ② Yoshinori Matsuura, et al., Katsuhide Yutani, Does hydrophobic interaction due to hydration contribute to protein stability even over 100 °C. 7th Asian Biophysics Association Symposium, 2011-2-1, New Delhi, India
- ③ Yoshinori Matsuura, et al., Katsuhide Yutani, Calorimetry of heat-reversible CutA1 proteins with a denaturation temperature higher than 100 °C. 21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics, 2010-8-2, Tsukuba

[図書] (計 1 件)

- ① 油谷克英、丸善 KK 「熱量測定・熱分析ハンドブック第2版」(2010) 超好熱菌由来蛋白質の熱安定性、pp296 (総ページ数 357)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

油谷 克英 (YUTANI KATSUHIDE)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・上級研究員

研究者番号：90089889

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

松浦 祥悟 (MATSUURA YOSHINORI)

独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・リサーチアソシエイト

研究者番号：50513462