

進化工学及びMDエンジンを用いたタンパク質の構造安定性と熱変性の研究

●山岸明彦

東京薬科大学生命科学部

〈研究の目的と進め方〉

蛋白質安定性および熱変性過程と蛋白質構造との関係を明らかにするため、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素をモデル酵素として、様々な耐熱性を持つ酵素に関して蛋白質の安定性と熱変性過程の評価を実験的に行う。同時に動力学専用並列計算機（MDエンジンSE）を用いてシミュレートし、実験との対応を検討する。実験と動力学計算の比較を行うことにより、動力学計算から蛋白質の構造安定性の情報を取得する方法を開発する。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 常温菌イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を出発材料として、分子工学的改変を行う。得られた変異型酵素遺伝子を大腸菌内で大量発現し、精製、耐熱性その他の性質を決定する。2) 既に、大腸菌と好熱菌（*T. thermophilus*）のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素に関して、蛋白質熱安定性に関する熱力学的定数を決定した。さらに、いくつかの耐熱性の異なる酵素に関して耐熱性の熱力学的定数の測定を開始する。3) 分子量7万、水分子を入れて7万原子のクーロン力のカットオフを行わない動力学計算を数十ps行うために、動力学専用並列型計算機を導入する。4) 動力学専用並列型計算機（MDエンジン）を用いて、これまでに好熱菌野生型イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の熱変性過程をシミュレートした。耐熱性の異なるイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素に関して熱変性過程をシミュレートする。変性過程を実験と比較し、また耐熱性の異なる酵素間で比較することから、耐熱性の差と熱変性過程の差の対応を検討する。

〈研究期間の成果〉

1) 酵母イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を材料として進化分子工学的に耐熱性の上昇した変異型酵素を多数獲得した。すなわち、常温菌酵素の遺伝子を好熱菌内で発現させると、常温菌酵素の耐熱性が低いために好熱菌は生育できない。常温菌遺伝子にランダムに変異を導入して、高温で生育可能となった変異株を単離した。それらの変異型遺伝子を大腸菌内で大量発現し、精製の後、耐熱性の評価をおこなった。アミノ酸変異の導入によってタンパク質の耐熱性が上昇していることが確認された。これまで、分子進化工学的に入手した耐熱性上昇変異酵素の変異部位を総合的に評価することにより、変異導入によって耐熱性上昇を設計する指針を得ることに成功した。

また、遺伝子の系統樹から全生物の共通の祖先は超好熱菌だったのではないかとこの仮説が提唱されている。この仮説を検討するために、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の祖先型配列を推定し、その祖先型変異酵素7種を作製した。祖先型変異酵素を大量発現、精製してその耐熱性の評価をおこなった。それらの変異酵素7つのうちの5つで耐熱性が上昇していた。この結果は「共通の祖先超好熱菌」仮説を支持している。またこの結果は、アミノ酸の1次配列情報と蛋白質安定性との系統樹を介

した関係を示す物である。さらに、一次構造情報のみに基づいたタンパク質耐熱化設計法の開発に成功したことになる。

2) 大腸菌、好熱菌、および枯草菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の尿素を用いた変性の自由エネルギー測定をおこなった。自由エネルギーを様々な温度で測定することから変性の比熱変化（ ΔC_p ）の値を推定した。 ΔC_p の値は常温菌に比べて好熱菌が顕著に低いことが明らかとなった。変性の自由エネルギーはタンパク質変性に伴い疎水性残基が露出ことに関連すると考えられている。従って、好熱菌タンパク質では変性後も疎水性相互作用が大きく残っているのでは無いかということが推定された。このことがこの好熱菌タンパク質の耐熱化機構と推定された。

3) タンパク質動力学計算専用計算機MDエンジンを導入した。

4) MDエンジンを用いて、RNAaseT1の水を含んだ全原子モデルによる遠距離相互作用の近似無しの高密度熱変性計算を行った。変性早期に消失する相互作用、変性の中間体で残る相互作用等を推定した。また、RNAaseT1の変性中間温度の構造をNMRを用いて推定した。動力学計算で推定された変性中間体の相互作用領域と、NMRで推定された変性中間温度での相互作用領域が良い一致をすることが明らかとなった。以上の結果は、動力学計算によって変性中間体の構造情報を得ることが可能であることを示している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1) 祖先型アミノ酸残基を推定して、祖先型アミノ酸残基の現存タンパク質への影響を測定するという実験は、そもそもの方法論から新規な研究である。研究によりこれまで論争となっていた「超好熱性共通の祖先」という仮説に実験的証拠を得ることができた。また、祖先型アミノ酸残基を導入することにより耐熱性を大変効率よく上昇させることができるという、タンパク質工学における画期的成果でもある。2) はこれまで、好熱菌タンパク質と相同な常温菌タンパク質を比較した数少ない研究結果であり、好熱菌タンパク質の変性状態における構造が異なっているのではないかと示唆している。つまり、変性状態が完全にランダムでなく部分的に構造を保持しているかもしれないという実験結果である。3) 4) 全原子モデルによる遠距離力の近似なしのこれだけの大型分子の計算は他に例がない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉 特になし。

〈今後の課題〉

1) では、発見された結論（祖先型アミノ酸残基がタンパク質の耐熱性を上昇させる）の一般性を確認する事が非常に重要である。2) 耐熱性の異なるタンパク質を材料として、熱力学的安定化機構の一般性、本質を探る。

3) さらに計算能力を向上させることにより、4) タンパク質熱安定性の比較研究を行う必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 111091847
M. Tamakoshi, Y. Nakano, S. Kakizawa, A. Yamagishi and T. Oshima. Selection of stabilized 3-isopropylmalate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* using host-vector system of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Extremophiles*, 5: 17-22 (2001)
2. 111091904
J. Miyazaki, S. Nakaya, T. Suzuki, M. Tamakoshi, T. Oshima, and A. Yamagishi. Ancestral residues stabilizing 3-isopropylmalate dehydrogenase of an extreme thermophile: Experimental evidence supporting the thermophilic common ancestor hypothesis. *J. Biochem.* 129: 777-782 (2001)
3. 202271700
C. Motono, T. Oshima and A. Yamagishi, High thermal stability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* resulted from low ΔC_p of unfolding. *Protein Eng.* 14: 961-966 (2001)
4. H. Matsuura, S. Shimotakahara, C. Sakuma, M. Tashiro, H. Shindo, K. Mochizuki, A. Yamagishi, M. Kojima, and K. Takahashi. Thermal unfolding of ribonuclease T1 studied by multi-dimensional NMR spectroscopy. *Biological Chemistry*, 385: 1157-1164 (2004)