

# 安定性指標に基づく蛋白質立体構造の予測法の確立

●油谷 克英

大阪大学蛋白質研究所（現、理化学研究所播磨研究所）

## ＜研究の目的と進め方＞

遺伝子は生物の全てを決定する情報を秘めている根幹物質であるが、生命活動を行う多様な生理活性を發揮しているのは、蛋白質である。蛋白質の生物活性は、アミノ酸配列によって規定される立体構造に厳密に依存している。遺伝子配列（アミノ酸配列）→蛋白質立体構造・機能、この関連を規定している暗号を読みとることは、今日のライフサイエンス研究における最も重要な課題の一つである。昨今では、すさまじい勢いで、各種ゲノムの遺伝子配列が決定されている。しかし、その遺伝子配列に記されている蛋白質の機能・構造に関する情報を推定することは既知相同蛋白質を除いてほとんど不可能である。その中であって、アミノ酸配列から立体構造を予測する有力な方法として、3D-1D法と呼ばれる方法がある。この方法では1次元の配列(1D)ととりうる3次元の立体構造(3D)との適合性を評価するが、その予測構造の適合評価の基礎となる現有の「評価関数」は、経験的なもので精度の高いものではない。近い将来、1000種程度あると言われている基本となる立体構造が全て解明された暁に、確率の高い予測法を確立するためには理論的・実験的に裏打ちされた精度の高い「評価関数」が必要となる。

3D-1D法の適合の評価をする為の多くの関数（「評価関数」；スコア表）が提案されている。太田ら（遺伝研）は、「評価関数」の3Dプロフィールの数値表は点突然変異体の安定性指標(DG)であると指摘し、正しい安定性の指標を得ることが構造予測の精度向上に直結すると提案している。一方、私たちは、系統的で網羅的なヒトリゾチーム変異型について、安定性変化と構造変化のデータを集積し、「安定性/構造」データベースを構築しつつある。それらのデータベースを基に、構造特性との関連で各安定化因子の寄与の程度を定量化する「安定性/構造」関数を導くのに成功しつつある。この関数を完成させ、これを基に「評価関数」を改良しようとするのが本研究課題である。

表1 ヒトリゾチーム変異型の種類

a	エントロピー型：Pro 変異型(6種), S-S 変異型(2種)
b	疎水性型：Ile 変異型 Ile → Val(5種), Ile → Ala(5種), Ile → Gly(2種) Val 変異型 Val → Ala(9種)
c	側鎖水素結合型：Tyr 変異型 Tyr → Phe(6種), Ser 変異型 Ser → Ala(6種), Thr 変異型 Thr → Val(5種), Thr → Ala(5種)
d	イオン結合変異型：E7Q, D18N, D67N, D49N, D102N, D120N
e	分子内部極性型：L8T, L12T, A32S, A9S, A92S, V93T, A96S, V99T, V100T
f	N 端残基変異型：K1M, K1A, M, P, G, EAEA (アンダーラインはN 端に付加)
g	削除型：Δ(L15/G16), Δ(A47/G48), ΔR101
h	左巻きヘリックス型：A または G への変異 11 種
i	Gly 部位での変異：G → A 変異型(11 種)
j	特定部位、分子内部型：56 位変異型(12 種), 59 位変異型(12 種)
k	特定部位、分子表面型：3 箇所(V2, V74, V110)で一連(各 19 種)
l	3SS(C77A/C95A)二重変異型：Ile → Val 変異型(5 種), Val → Ala 変異型(9 種)
m	3SS(C77A/C95A)二重変異型：I59A, I59G (水分子導入)
n	変異型安定性 3D プロフィール検証型 (10 種)
o	アラカルト型：Q86D/A92D (Ca 付加), I56T, D67H (アミロイド)

## ＜研究開始時の研究計画＞

表1には、構造上、特徴的な変異型が150種ほど記されている。この変異型のうち既に半数以上の変異型が作成され、置換に伴う安定性変化を示差走査熱量計(DSC)で、置換に伴う構造変化をX線結晶構造解析で解明し、それらの構造変化の特徴と安定性変化の相関を求めている。本研究課題では、まず、表1の変異型全てについて安定性変化と構造変化のデータを集積することである。

## ＜研究期間の成果＞

上に述べたように、系統的網羅的ヒトリゾチームの変異型を用いて、置換による構造変化をX線結晶構造解析で安定性変化をDSCで測定することにより得られた構造変化/安定性のデータセットを用いて、蛋白質の安定化因子の構造関数のパラメータを次のように求めることができた12)。

網羅的な我々が注目した安定化因子は、疎水性相互作用、水素結合、分子内水分子、分子内キャビティ、側鎖のエントロピー、二次構造傾向性である。これらの安定性への寄与を、それぞれDDGHP, DDGHB, DDGH2O, DDGcav, DDGconf, DDGspとする。変異型の安定性変化(DDG)がこれらの和であると仮定すると、次式が成立する。

$$\Delta\Delta G = \Delta\Delta G_{HP} + \Delta\Delta G_{HB} + \Delta\Delta G_{H2O} + \Delta\Delta G_{sp} + \Delta\Delta G_{cav} + \Delta\Delta G_{conf} \quad (1)$$

各々の安定化因子の寄与を、次のように構造変化と関連づける。

$$\Delta\Delta G_{HP} = \alpha \Delta\Delta ASA_{non-polar} + \beta \Delta\Delta ASA_{polar} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta G_{HB} = \gamma_{pp} \sum r_{HB[pp]}^{-1} + \gamma_{pw} \sum r_{HB[pw]}^{-1} + \gamma_{ww} \sum r_{HB[ww]}^{-1} \quad (3)$$

$$\Delta\Delta G_{H2O} = \delta n_{H2O} \quad (4)$$

$$\Delta\Delta G_{sp} = \epsilon_{[a]} \Delta pro_{[a]} + \epsilon_{[b]} \Delta pro_{[b]} \quad (5)$$

$$\Delta\Delta G_{cav} = \zeta \Delta V_{cav} \quad (6)$$

ここでASAnon-polarとASApolarはそれぞれC/S原子、N/O原子のASA値を、rHB[pp], rHB[pw]とrHB[ww]はそれぞれ蛋白質-蛋白質間、蛋白質-水分子間、水分子-水分子間の水素結合距離、nH2Oは分子内水分子の数、pro[a]とpro[b]はアミノ酸残基の二次構造傾向性、Vcavはキャビティ体積を示し、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ は係数(パラメーター)である。

式(1)から算出される安定性 ( $\Delta\Delta G_{est}$ ) と、カロリーメトリーから得られる実験値 ( $\Delta\Delta G_{exp}$ ) が最も適合する  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$  の値を最小自乗法で求めることができた。これらのパラメータは表2に示すようにヒトリゾチームと多くの変異型の安定性と構造変化が調べられているT4リゾチームのそれぞれについて、及び両者のデータを用いて得ることができた4)。これらのパラメーターの値は、分子内部に埋れている疎水性表面積、親水性表面積が1 Å<sup>2</sup>増加するとそれぞれ0.154 J/molの安定化、0.026 kJ/molの不安定化に影響し、3 Åの水素結合形成は、蛋白質-蛋白質間、蛋白質-水分子間、水分子-水分子間で

それぞれ8.6, 4.7, 5.7 kJ/molの安定化, 水1分子が蛋白質内部に導入されるエントロピー的影響は8.45 kJ/molの不安定化, キャビティが1 Å<sup>3</sup>増えると0.052 kJ/molの不安定化に影響することを示している。また、二次構造傾向性の影響は、例えば、Alaは $\alpha$ -helix形成能, Valは $\beta$ -strand形成能が高いことが知られているが、 $\alpha$ -helix上でのVal→Ala置換は3.0 kJ/molの安定化,  $\beta$ -strand上での同置換は1.5 kJ/molの不安定化であることが分かった。

表2 ヒトリゾチーム(HL)変異型とT4リゾチーム(T4L)変異型,及び両変異型を用いて決定した安定化因子のパラメータ。

		HL	T4L	HL + T4L
$\Delta\Delta G_{HP}$	$\alpha$	0.154	0.122	0.146
	$\beta$	-0.026	0.049	0.021
	$\gamma_{[\pi\pi]}$	25.70	16.44	22.08
$\Delta\Delta G_{HB}$	$\gamma_{[\pi\sigma]}$	14.13	16.36	9.13
	$\gamma_{[oe]}$	17.13	--	7.70
	$\delta$	-8.45	--	-4.51
$\Delta\Delta G_{pro}$	$\epsilon_{[e]}$	5.09	0.79	3.33
	$\epsilon_{[o]}$	2.05	--	0.11
$\Delta\Delta G_{cw}$	$\xi$	-0.052	-0.088	-0.073
	R	0.89	0.89	0.86

また、種々な特異な構造特性における役割を明らかにすることができた。イオン結合の安定化の寄与をそのイオン結合の分子内部への埋もれ度との関係2)、ターン構造残基の安定性とfoldingへの役割1)。ヒトリゾチームの6箇所に存在する左巻きヘリックス構造部位でのGly以外の残基の構造と安定に及ぼす影響5,7)を明らかにした。

分子の表面で、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ループに位置する3箇所の残基(それぞれVal110, Val2, Val74)を系統的に疎水性3)及び親水性残基9)に変異させて、安定性パラメータがどのように変化するかを調べた。その結果、置換に伴い分子表面での水素結合の変化が安定性に重要な影響を与えることが判明し、分子内部と分子表面での水素結合と水分子の寄与の違いを定量的に明らかにすることができた。

更に、アミノ酸残基の疎水性パラメータの簡便利用に供するために、表3に示すように分子内部に完全に埋もれている各アミノ酸残基の安定性のパラメータを公表した8)。

表3 各アミノ酸が安定性に及ぼす影響

アミノ酸	$\Delta\Delta G_{aa}^*$ (kJ/mol)
Ala	9.8
Arg	7.3
Asn	3.6
Asp	4.9
Cys	3.0
Gln	2.4
Glu	4.4
Gly	0.0
His	11.9
Ile	17.2
Leu	17.0
Lys	10.5
Met	11.9
Phe	23.0
Pro	15.0
Ser	2.6
Thr	6.9
Trp	24.2
Tyr	17.2
Val	15.3

\* $\Delta\Delta G_{aa} = \Delta\Delta G_{HP} + \Delta\Delta G_{conf}$

て、置換による安定性変化と構造変化を基に、安定性/構造相関パラメータを求めた例は内外に見られない。これらのパラメータを用いて、好熱菌由来蛋白質の熱安定化メカニズムを理解するのに重宝されている。

#### <今後の課題>

蛋白質の構造変化と安定性変化のパラメータを求めることができたので、これを評価関数として誰もが使える形に整備するのが今後の課題である。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文 (査読つき)

- 0202112115 K. Takano, Y. Yamagata and K. Yutani, Role of Amino Acid Residues at Turns in the Conformational Stability and Folding of Human Lysozyme. *Biochemistry* 39, 8655-8665 (2000)
- 0202112122 K. Takano, Tsuchimori, Y. Yamagata, and K. Yutani, Contribution of Salt Bridges near the Surface of a Protein to the Conformational Stability. *Biochemistry* 39, 12375-12381 (2000)
- 0202112126 J. Funahashi, K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, Role of Surface Hydrophobic Residues in the Conformational Stability of Human Lysozyme at Three Different Positions. *Biochemistry* 39, 14448-14456 (2000)
- 0202112132 J. Funahashi, K. Takano, and K. Yutani, Are the parameters of various stabilization factors estimated from mutant human lysozymes compatible with other proteins? *Protein Engineering*, 14, 127-134 (2001)
- 0202112145 K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, Role of Amino Acid Residues in Left-handed Helical Conformation for the Conformational Stability of a Protein. *Proteins*, 45, 274-280 (2001)
- 0202112136 K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, Contribution of Polar Groups in the Interior of a Protein to the Conformational Stability. *Biochemistry* 40, 4853-4858(2001)
- 0202112139 K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, Role of Non-glycine Residues in Left-handed Helical Conformation for the Conformational Stability of Human Lysozyme. *Proteins*, 44, 233-243 (2001)
- 0202112142 K. Takano and K. Yutani, A new Scale for Side Chain Contribution to Protein Stability Based on the Empirical Stability Analysis of Mutant Proteins. *Protein Engineering* 14, 525-528 (2001)
- 0207281010 J. Funahashi, K. Takano, Y. Yamagata, and K. Yutani, Positive Contribution of Hydration Structure on the Surface of Human Lysozyme to the Conformational Stability. *J. Biol. Chem.*, 277: 21792-21800 (2002)
- 0601301857 K. Takano, Y. Yamagata & K. Yutani, Buried Water Molecules Contribute to the Conformational Stability of a Protein. *Protein Engineering* 16, 5-9 (2003)
- 0311121726 J. Funahashi, Y. Sugita, A. Kitao and K. Yutani, How can free energy component analysis explain the difference in protein stability caused by amino acid substitutions? Effect of three hydrophobic mutations at the 56th residue on the stability of human lysozyme. *Protein Engineering* 16, 665-671 (2003)

#### <国内外での成果の位置づけ>

ここで示したように、系統的で網羅的な変異型を用い

4) その他顕著なもの

12. 0601310935 船橋順、油谷克英, 蛋白質立体構造から安定化のメカニズムを定量的に理解する方法, 日本結晶学会誌, 47, 253-260 (2005)