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

協和発酵工業(株) 医薬研究センター 創薬科学研究所 船橋 順
理化学研究所 播磨研究所 油谷克英

Jun FUNAHASHI and Katsuhide YUTANI: How to Understand the Mechanism of Protein Stability from the Crystal Structure of a Protein

Mutant proteins are useful for study on the mechanism of protein stability. However, it is difficult to evaluate the changes in stability due to mutation, because contributions of amino acid residues to the conformational stability differ depending on their locations even if the same residues are substituted. In order to evaluate each contribution of several factors responsible for protein stability, we determined the crystal structures and measured the protein stability for more than a hundred of mutant human lysozymes. Analyzing this structure/stability database, the parameters of each stabilization factor, such as hydrophobic effect and hydrogen bond, could be estimated. These parameters are available for understanding the thermostabilization mechanism of the proteins from hyperthermophiles and for the computer-aided drug design.

1. はじめに

蛋白質は、それぞれ生命を維持するために必要な固有の機能を有しており、それらの機能は蛋白質の立体構造に起因している。その立体構造に関する情報はアミノ酸配列上に含まれているが、その解説はいまだに進んでいない。全ヒトゲノムが解読された今日、膨大なアミノ酸配列データをいかにして生体機能の理解につなげ、医学利用などに発展させていくかが現代のポストゲノム科学の課題であり、盛んに研究が行われている。しかしその一方で、機能発現に必要な立体構造を構築している個々のアミノ酸残基が、その立体構造の安定性にどのような寄与をしているかは、いまだに十分に説明できていないのが現状である。

蛋白質の安定化メカニズムを、立体構造と関連させて定量的に理解することができれば、機能を損なわずに蛋白質を安定化させるデザインが可能となり、種々の過酷な環境下で期待する機能を有する蛋白質の創生も夢ではなく、医学や産業への貢献は計りしれない。例えばDNA複製技術のPCR (Polymerase Chain Reaction) 法で使われるDNAポリメラーゼも、高温化で機能を有する蛋白質 (好熱菌由来蛋白質) であり、このように耐熱性・安定性に優れた蛋白質はすでに多くの分野で貢献している。

蛋白質を安定化する因子としては、蛋白質内部の疎水性相互作用の増強、水素結合・塩結合・SS結合の形成、二次構造 (α -helix, β -strand など) の強化、金属イオンの導入など、さまざまな因子が提案され、個々には実験的に証明

されている。分子生物学の進展によりアミノ酸置換蛋白質の研究が盛んになり相当量のデータが蓄積されているが、アミノ酸置換によってそれらの安定化因子を蛋白質に導入したとしても、必ずしも期待どおりの安定化を示さない場合が多い。表1に数種の蛋白質における疎水性残基変異型の安定性変化を、例として示す。表中のアミノ酸置換は、安定化因子の1つである疎水性相互作用を減少させるため、安定性の低下が期待される。ここでは置換部位周辺の環境の違いを補正するため、野生型構造における残基の埋め度で補正してあるが、例えばVal $\rightarrow$ Ala置換では安定性が変化しないものから、20 kJ/mol も不安定化するものなど度合いはさまざまであり、置換により疎水性相互作用以外の安定化因子にも影響が及んでいることを示唆している。このように、同じアミノ酸置換を導入した場合でさ

表1 4種の蛋白質^{a)}における疎水性変異型の安定性変化^{b)}
(Changes in stability of the hydrophobic mutants of four different proteins.)

変異	調査数	$\Delta\Delta G^b$ (kJ/mol)			$\Delta\Delta G/-CH_2-$ (kJ/mol)
		最小	最大	平均	
Ile $\rightarrow$ Val	9	-2.1	-9.3	-5.4	-5.4
Val $\rightarrow$ Ala	11	0.0	-19.7	-10.5	-5.3
Ile $\rightarrow$ Ala	9	-4.6	-21.3	-15.9	-5.3
Leu $\rightarrow$ Ala	17	-7.1	-25.9	-14.6	-4.9

a) スタフィロコッカルスクレアーゼ, T4リゾチーム, バルナーゼ, ジーン5プロテイン

b) それぞれの置換残基が100%分子内部に埋め込まれていると換算した値

え、期待どおりの安定性変化を得るのは難しい。蛋白質の安定性は、安定化する因子と、不安定化する因子が複雑に絡み合い、その微妙なバランス（ほんのわずかなエネルギー差）の上に成り立っていて、結果的に変性のギブスエネルギー変化はただか40 kJ/mol程度になる（Marginal Stability）。²⁾ そのため、一残基置換といったほんの少しの変化であっても、その変性のギブスエネルギー変化の何割かに相当し、見かけのうえでは著しい安定性変化となる。

このような微妙なバランスで蛋白質の安定性は保たれているため、安定化メカニズムを解明するには、複雑な要因を解析できるだけのデータ量が必要となる。そこでわれわれは、実験的扱いが容易なヒトリゾチームを用い、系統的・網羅的にアミノ酸置換変異型を作製し、そのアミノ酸置換が立体構造と安定性に及ぼす影響を詳細に調べている。ここでは、置換による立体構造変化を、安定性変化と比較することにより、蛋白質安定化のメカニズムを定量的に解明しようとする試みについて詳述する。さらに、それらを用いて好熱菌由来蛋白質の安定化メカニズムを立体構造より解明する試み、またドラッグデザインや蛋白質製剤など、創薬化学に適用できる可能性の例を紹介する。

2. ヒトリゾチーム疎水性変異型を用いた研究

ヒトリゾチーム（HL：図1）は130残基・分子量14500の蛋白質で、X線結晶構造解析や精度の高い物理化学的研究が進んでいる。われわれはまず、安定化因子の1つである疎水性相互作用が安定化に及ぼす影響を明らかにするため、HLの分子内部や分子表面などさまざまな環境下において Ile → Val（5カ所）³⁾ と、Val → Ala（7カ所）⁴⁾ 変異型を作製し、それらの安定性を熱測定（示差走査熱量計）で、構造変化をX線結晶構造解析によって調べた。その結果、同じアミノ酸置換でも表1と同様、安定性変化に差があった。そこで、その差の原因を明らかにするために、置換による二次構造傾向性（二次構造中でのアミノ酸残基の存在頻度）の変化を考慮した。すると、 $\Delta\Delta ASA_{HP}$ と安定性変化（ $\Delta\Delta G$ ）との間に相関があることがわかった（図2）。⁵⁾ ここで $\Delta\Delta ASA_{HP}$ とは、変性による疎水性アミノ酸側鎖の溶媒露出表面積（Accessible Surface Area：ASA）変化の、変異型と野生型の差を示す。このことは、変性により溶媒に露出する疎水性表面積（蛋白質内部に埋め込まれている疎水性残基の面積）の減少に従って安定性が低下することを意味する。この良い相関は、置換残基のみ、または置換残基周辺の $\Delta\Delta ASA_{HP}$ では得られず、分子全体の $\Delta\Delta ASA_{HP}$ を用いることで初めて得ることができた。つまり、置換による影響は置換部位周辺だけでなく、分子全体に及んでいることを示している。図2に示すように、置換により二次構造の傾向性が高くなる変異型、例えば α -helix上での Val → Ala 変異型の $\Delta\Delta G$ は、その $\Delta\Delta ASA_{HP}$ から期待されるよりも一様に高くなり、逆に二次構造の傾向性が低くなる変

図1 野生型ヒトリゾチームの立体構造。(Structure of the wild-type human lysozyme.)

図2 HL変異型の安定性変化と疎水性溶媒露出表面積変化の関係。⁵⁾ (Correlation of $\Delta\Delta ASA_{HP}$ with $\Delta\Delta G$ for the HL mutants.) ●, ▽, △はそれぞれ置換により二次構造傾向性が変わらない変異型, 低くなる変異型, 高くなる変異型を示す。

異型、例えば β -strand上での Val → Ala 変異型の $\Delta\Delta G$ は期待値よりも低くなっている。このことは、複数の安定化因子（この場合は疎水性相互作用と二次構造傾向性）の影響を加算的に近似できる可能性を示している。

3. ヒトリゾチームの系統的・網羅的変異型を用いた研究

このように系統的な変異型の安定性変化と構造変化を関連付けることで、個々の安定化因子の役割を示せる可能性があることがわかった。そこでわれわれは、さまざまな安定化因子の寄与を明らかにするために、表2に示すようなHLの系統的・網羅的変異型を作製してきた。置換部位は分子内部や分子表面、 α -helix上や β -strand上、loop上などさまざまな環境下にあり、置換する残基も多様である。これらの変異型のX線結晶構造解析を行った結果、小さい残基に置換することによって分子内部に水分子が新た

表2 取り扱ったHL変異型の種類. (The list of HL mutants examined in our studies.)

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	側鎖水素結合同型: 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カ所 (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), al→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)

に取り込まれるなど、一残基置換がさまざまな構造変化を起こすこともわかった。⁴⁾ この系統的・網羅的変異型ヒトリゾチームの立体構造/安定性のデータを用い、すべての変異型の安定性変化を統一的に説明する、つまり安定化因子の寄与を定量的に見積もる新たな試みを行っている。⁶⁾

われわれ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 $\Delta\Delta G_{HP}$ 、 $\Delta\Delta G_{HB}$ 、 $\Delta\Delta G_{H_2O}$ 、 $\Delta\Delta G_{cav}$ 、 $\Delta\Delta G_{conf}$ 、 $\Delta\Delta G_{sp}$ とする。変異型の安定性変化 ($\Delta\Delta G$) がこれらの和であると仮定すると、次式が成立する。

$$\Delta\Delta G = \Delta\Delta G_{HP} + \Delta\Delta G_{HB} + \Delta\Delta G_{H_2O} + \Delta\Delta G_{sp} + \Delta\Delta G_{cav} + \Delta\Delta G_{conf} + \sum \Delta\Delta G_i \quad (1)$$

ここで $\Delta\Delta G_i$ は上に述べた以外の安定化因子の寄与を示し、イオン結合など今後定量化していく予定のものを示すが、現状では目的以外の因子に影響しないと判断できる変異型に限定して解析している。例えば、表2中のイオン結合変異型は、イオン結合の影響を考慮する必要があるため、ここでの解析には用いていない。それぞれ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。

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

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

$$\Delta\Delta G_{H_2O} = \delta n_{H_2O} \quad (4)$$

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

図3 式(1)を用いて54種のHL変異型をフィッティングした結果。⁶⁾ (The results of the fitting according to Equation 1 for 54 HL mutants.) 点線は $y = x$ を示す。

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

ここで $ASA_{non-polar}$ と ASA_{polar} はそれぞれC/S原子、N/O原子のASAを、 $r_{HB[pp]}$ 、 $r_{HB[pw]}$ と $r_{HB[ww]}$ 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、 n_{H_2O} は分子内水分子の数、 $pro_{[\alpha]}$ と $pro_{[\beta]}$ はアミノ酸残基の二次構造傾向性、 V_{cav} はキャビティ体積を示し、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ は係数 (パラメータ) である。 $pro_{[\alpha]}$ と $pro_{[\beta]}$ の値と $\Delta\Delta G_{conf}$ は文献値を用いた。54種のHL変異型のデータを基に、式(1)から算出される安定性 ($\Delta\Delta G_{est}$) と、カロリメトリーから得られる実験値 ($\Delta\Delta G_{exp}$) が最も適合する α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ の値を最小自乗法で求めた。その結果、相関係数 (R) が0.89、標準偏差 (SD) が2.2 kJ/molでそれぞれの係数を決定することができた。図3と表3にその結果を示す。これらのパラメータの値は、分子内部に埋れ

表3 HL 変異型と T4L 変異型, および両変異型を用いて決定した安定化因子のパラメータ.⁶⁾ (The parameters of each stabilization factor determined using HL, T4L, and both of them.)

		HL	T4L	HL + T4L
$\Delta\Delta G_{HP}$	α	0.154	0.122	0.146
	β	-0.026	0.049	0.021
	$\gamma_{[\pi\pi]}$	25.70	16.44	22.08
$\Delta\Delta G_{HB}$	$\gamma_{[\pi\omega]}$	14.13	16.36	9.13
	$\gamma_{[\omega\omega]}$	17.13	—	7.70
$\Delta\Delta G_{H_2O}$	δ	-8.45	—	-4.51
$\Delta\Delta G_{pro}$	$\epsilon_{[\alpha]}$	5.09	0.79	3.33
	$\epsilon_{[\beta]}$	2.05	—	0.11
$\Delta\Delta G_{cav}$	ξ	-0.052	-0.088	-0.073
R		0.89	0.89	0.86

ている疎水性表面積, 親水性表面積が1 Å²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 Å³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 α -helix 形成能, Val は β -strand 形成能が高いことが知られているが, α -helix 上での Val → Ala 置換は3.0 kJ/mol の安定化, β -strand 上での同置換は1.5 kJ/mol の不安定化であることを示している. 興味深いことに, これらパラメータの符号は, すべて同時に決定したにもかかわらず, 論理的に予測される符号 (例えば水素結合は安定化に寄与するから+など) とすべて一致していた.

4. その他の安定化因子について

このように, 変異型蛋白質の立体構造/安定性のデータを用いて, さまざまな安定化因子の寄与を定量的に見積もることができる可能性が示唆された. さらに多くのデータを用いることによって, 蛋白質の安定性に寄与するほかの因子についても, 同様に定量化できると考えられる. 次にイオン結合⁷⁾と水和構造⁸⁾を例として挙げる.

イオン結合は, 疎水性相互作用などと同様に安定化に重要だと考えられている. 高い熱安定性をもつ好熱菌由来蛋白質は, 常温菌由来蛋白質に比べ, 統計的に分子表面のイオン結合が多いことから, それらが蛋白質の安定性に寄与していると注目されている. そこでHLの分子表面でイオン結合を形成している残基を置換した6変異型 (表2) を作製して熱測定を行い, 3変異型については構造解析を行った. 結果, イオン結合を1本除去した変異型は2.8 ~ 9.4 kJ/mol (pH 4.0) と, さまざまに不安定化していた. 構造解析した3変異型について, 先に決定されたパラメータを用いてイオン結合以外の安定化因子の寄与を算

表4 分子内部と分子表面の水素結合と水分子の寄与. (Contributions of hydrogen bonding and water molecules inside and outside of a protein.)

	パラメータ	分子内部	分子表面 [†]
$\Delta\Delta G_{HB}$ or $\Delta\Delta G_{HB}^{\dagger}$	$\gamma_{[pp]}$ or $\gamma_{[pp]}^{\dagger}$	25.70	4.47
	$\gamma_{[pw]}$ or $\gamma_{[pw]}^{\dagger}$	14.13	4.14
	$\gamma_{[ww]}$ or $\gamma_{[ww]}^{\dagger}$	17.13	1.19
$\Delta\Delta G_{H_2O}$ or $\Delta\Delta G_{H_2O}^{\dagger}$	δ or $\delta^{\dagger}$	-8.45	-1.21

出した結果, プロトネーションのためイオン結合の安定性への寄与が消失すると考えられる pH 2.0 での熱測定の実測値とほぼ一致していた. そこで, イオン結合の寄与 ($\Delta\Delta G_{ELE}$) を pH 2.0 と pH 4.0 の $\Delta\Delta G$ の差として算出すると3.2 ~ 8.4 kJ/mol となり, これらはイオン結合を形成している N/O 原子の埋れ度と相関し, 完全に埋れている場合は約9 kJ/mol の安定化に寄与するということがわかった.⁷⁾

水和構造は, 蛋白質の分子表面に rigid に形成していることがX線結晶構造解析により報告されており,⁹⁾ 蛋白質の安定性に影響を及ぼしていると考えられる. そこで, HLの分子表面の Val (3カ所) を一連のアミノ酸に置換した19変異型 (表2) を作製し, 熱測定と構造解析を行った. 構造解析の結果, 置換部位周辺で観測された水素結合や結合水分子の数が増えていることがわかった. 水和構造の変化の寄与 ($\Delta\Delta G_{HS}$) は分子表面の水素結合や結合水分子の数の変化と関連すると考えられるが, 式 (3) や式 (4) で表される分子内部での影響とは大きさが違うと考えられる. そこで, $\Delta\Delta G_{HS}$ を以下の式で表した.

$$\begin{aligned}\Delta\Delta G_{HS} &= \Delta\Delta G_{HB}^{\dagger} + \Delta\Delta G_{H_2O}^{\dagger} \\ &= \gamma_{[pp]}^{\dagger} \sum r_{HB[pp]}^{\dagger-1} + \gamma_{[pw]}^{\dagger} \sum r_{HB[pw]}^{\dagger-1} \\ &\quad + \gamma_{[ww]}^{\dagger} \sum r_{HB[ww]}^{\dagger-1} + \delta^{\dagger} n_{H_2O}^{\dagger}\end{aligned}\quad (7)$$

ここで†印は分子表面のものであることを示す. イオン結合のケースと同様, 先に決定されたパラメータを用いて算出したほかの因子の寄与を, $\Delta\Delta G_{exp}$ から差し引いた値を $\Delta\Delta G_{HS}$ とし, 式 (7) を用いてパラメータを算出した. 表4に示すように, 分子内部の変化に比べれば影響は少ないが, 分子表面の水和構造も蛋白質の安定性に影響し, それらを定量化することができた.⁸⁾

例に示したとおり, 立体構造/安定性のデータから得られたパラメータを用いることによって, これまで考慮した安定化因子以外の因子の寄与についても, 同様に定量化できると考えられる. 今後, それらの因子に影響を与える系統的変異型の実験結果を基にした定量化が期待される.

5. ヒトリゾチームで決定されたパラメータはほかの蛋白質にも適用できるか?

HLで定量化することができた安定化因子の寄与が, ほ

図4 HLのパラメータを用いて算出したT4L変異型(54種)の安定性と実測値の相関.⁶⁾ (The relation between experimental and estimated $\Delta\Delta G$ of 54 mutant T4L using the parameters derived from HL mutants.) (a) PDB登録構造のASAを用いたプロット. (b) B-factorが高い原子を除いたASAを用いたプロット.

図5 式(1)を用いてフィッティングした結果.⁶⁾ (The results of the fitting according to Equation 1.) 点線は $y = x$ を示す. (a) T4L変異型を用いた結果. (b) HL変異型(○)とT4L変異型(●)の両者を用いた結果.

かの蛋白質にも同様に適用できるかどうかを確認するため、変異型の立体構造/安定性のデータが豊富なT4リゾチーム(T4L)を用いて検証した。⁶⁾ 文献で安定性が報告されている変異型の中から、HLの場合と同様の観点で54種の変異型を選択し、立体構造はPDBより、安定性データは文献より抽出した。

式(1)で算出されるT4L変異型の $\Delta\Delta G_{\text{est}}$ と実測値との相関を図4aに示すが、 $\Delta\Delta G_{\text{est}}$ と $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ の差が非常に大きい($SD = 10.0$ kJ/mol)。そこで、差が大きい変異型についてその差に起因する因子を調べたところ、分子表面に位置するLysやArg残基の配座が野生型と異なり、 $\Delta\Delta ASA_{\text{polar}}$ の値が極端に大きくなっていたためであった。PDB登録構造におけるこれらの残基の温度因子(B-factor)はいずれも約100 Å²と非常に高く、その構造不確定性に

よりずれが生じていることがわかった。一方、われわれが解析に用いたHL変異型のB-factorはすべて60 Å²以下である。そこで、T4L変異型の構造から、B-factorが70 Å²以上の原子を除外したASAを用いて再計算した相関を図4bに示す。この場合、 $\Delta\Delta G_{\text{est}}$ と $\Delta\Delta G_{\text{exp}}$ の差は少なくなっていた($SD = 7.6$ kJ/mol)。 $\Delta\Delta G_{\text{est}}$ は $\Delta\Delta ASA$ の値に大きく影響を受けるため、B-factorの低い、精度の高い構造データを使用することが必要である。

このように、HLから得られたパラメータを用いることにより、T4Lの立体構造から安定性を粗く見積もることができた。そこで次に、B-factorが高い原子が多かった変異型を除いたT4L変異型(48種)のデータのみを用いてパラメータを決定、またはHLとT4Lの両方の変異型データ(110種)を用いてパラメータを決定することを試みた。そ

の結果, T4 リゾチームだけの場合は $R = 0.89$ ($SD = 3.9$ kJ/mol) (図 5a), 両者の場合は $R = 0.86$ ($SD = 4.3$ kJ/mol) (図 5b) でそれぞれのパラメータを決定した. 決定されたパラメータを表 3 に示す. ただし, T4L 変異型は, β -strand 上での変異型や, 置換により水分子-水分子間の水素結合や分子内水分子に変化が生じた変異型がなかったため, それらのパラメータは算出できなかった. 表 3 に示すとおり, 異なる蛋白質, 種々の置換部位での変異型のデータであるにもかかわらず, 各パラメータの値は非常に近い値になっていた. このことは, 安定化因子は蛋白質の種類に依存せず, 普遍的なものとして定量化できる可能性を示している. 次項に, これらのパラメータをほかの研究に適用できる可能性について例を挙げる.

6. 好熱菌蛋白質の安定性メカニズム解明への適用

好熱菌のうちでも, 水の沸騰点近くの温度で生育する超好熱菌由来蛋白質が最近精力的に研究されている. それらの変性温度は常温菌由来蛋白質に比べ非常に高く, 一般にその菌の生育温度 100°C より高い. この安定化のメカニズムとして, さまざまな因子が提案されているが, 超好熱菌由来蛋白質に特徴的な安定化因子はいまだ見出されていない. はじめに述べたように, 蛋白質の安定性はわずかなエネルギーバランスで保たれているので, 安定化因子が少し変化しただけでも安定性が見かけ上異常に高くなったように見える. そのため, 好熱菌由来蛋白質の安定化のメカニズムを知るためには, 定性的に構造の特徴を常温菌由来の相同蛋白質と見比べるだけでは不十分である. そこで, これまで述べてきたパラメータを利用して, 好熱菌由来蛋白質の安定性のメカニズムをどのように理解するかについて, 2 つの蛋白質を例に挙げて記す.^{10), 11)}

超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来トリプトファン合成酵素 α サブユニット ($Pf\text{-Trp}\alpha$) は常温菌 *Salmonella typhimurium* 由来の同 α サブユニット ($St\text{-Trp}\alpha$) と比べて, 熱安定性が約 35°C 高い ($\text{pH } 9.5$). 両蛋白質の熱測定の結果から, $Pf\text{-Trp}\alpha$ の熱安定化はエンタルピーではなく, エントロピーの寄与であることが示されている. $St\text{-Trp}\alpha$ の構造は $\alpha_2\beta_2$ 複合体として既知であり,¹²⁾ $Pf\text{-Trp}\alpha$ はわれわれのグループによって最近解析された.¹⁰⁾ そこで両者の構造を比較し, HL のパラメータを用いて両蛋白質の安定化因子の寄与を推定した (表 5). 疎水性相互作用の寄与 ($\Delta\Delta G_{\text{HP}}$) は -79.8 kJ/mol で, $St\text{-Trp}\alpha$ のほうが, $Pf\text{-Trp}\alpha$ より安定化への寄与が大きいことを示している. また, キャビティ (ΔG_{cav}) と静電的相互作用 ($\Delta\Delta G_{\text{ELE}}$) の寄与はそれぞれ 11 kJ/mol, 42.7 kJ/mol であり, これらの因子は $Pf\text{-Trp}\alpha$ の安定性への寄与のほうが大きい. 一般に, 疎水性相互作用は蛋白質の安定化に重要な役割を果たしていると言われていたが, ここに示すように $Pf\text{-Trp}\alpha$ の高い熱安定性は, 疎水性相互作用の増加によるのではなく, キャビティ体積の

表 5 構造より見積もったそれぞれの安定化因子の寄与 ($\text{Trp}\alpha$).¹⁰⁾ (Estimate of the contribution of each stabilization factor from the structure of $\text{Trp}\alpha$.)

	$Pf\text{-Trp}\alpha$	$St\text{-Trp}\alpha$	$\Delta (= Pf - St)$
<i>Difference in ASA values</i>			
(D - N)			
C/S atoms ($\text{\AA}^2$)	16449	16918	-469
N/O atoms ($\text{\AA}^2$)	6953	7214	-261
ΔG_{HP} (kJ/mol)	2837.3	2917.1	-79.8
Cavity Vol. (probe $1.4 \text{ \AA}$) ($\text{\AA}^3$)	226.75	318.07	-91.32
ΔG_{cav} (kJ/mol)	-27.2	-38.2	11.0
Total number of residues	248	268	-20
ΔG_{conf} at 25°C (kJ/mol)			291.8
ΔG_{conf} at 60°C (kJ/mol)			326.2
<i>Electrostatic energy</i>			
ΔG_{ELE} (kJ/mol)	80.4	37.7	42.7

表 6 構造より見積もったそれぞれの安定化因子の寄与 (PRAI).¹¹⁾ (Estimate of the contribution of each stabilization factor from the structure of PRAI .)

	$Tm\text{-PRAI}$	$Tt\text{-PRAI}$	$\Delta (= Tm - Tt)$
<i>Difference in monomer ASA values</i>			
(D - N)			
C/S atoms ($\text{\AA}^2$)	13097	13171	-74
N/O atoms ($\text{\AA}^2$)	5247	5097	150
ΔG_{HP} (kJ/mol)	1881	1896	-15
<i>Difference in dimer interface area</i>			
C/S atoms ($\text{\AA}^2$)	1765	1440	325
N/O atoms ($\text{\AA}^2$)	1306	1074	232
ΔG_{HP} (kJ/mol)	238	194	44
Cavity Vol. (probe $1.4 \text{ \AA}$) ($\text{\AA}^3$)			
monomer	15	80	-65
ΔG_{cav} (kJ/mol)	-0.8	-4.2	3.5
dimer	76	312	-236
ΔG_{cav} (kJ/mol) (dimer)	4.0	-16.2	12.2

減少, 静電的相互作用 (イオン結合) の増加, および残基エントロピー項の寄与に依存していることがこの解析によってわかった.¹⁰⁾

超好熱菌 *Thermotoga maritima* のホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ ($Tm\text{-PRAI}$) と高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の同蛋白質 ($Tt\text{-PRAI}$) は, いずれも 2 量体構造で, その構造はサブユニット界面で疎水性の突出部が互いに入り組んでいる. $Tt\text{-PRAI}$ は酸性領域で単量体に解離し変性するが, $Tm\text{-PRAI}$ は, $Tt\text{-PRAI}$ がすでに変性している $\text{pH } 2.3$ でも 2 量体を維持し intact な構造であることが知られている. そこで, $Tm\text{-PRAI}$ の 2 量体安定化の原因を両者の構造から調べた. 表 6 に HL のパラメータを用いて推定した, 両蛋白質の安定化因子の寄与を示す. 疎水性相互作用の寄与により, 単量体の場合 $Tt\text{-PRAI}$ のほうが 15 kJ/mol 安定化されているが, 2 量体のサブユニット接触界面では, $Tm\text{-PRAI}$ のほうが 44 kJ/mol 安定

化されている。つまり *Tm*-PRAI の安定性への疎水性相互作用の寄与は、単量体では *Ti*-PRAI よりも少ないが、接触界面でより大きく安定化されていることを示している。また、キャビティ減少による安定化への寄与は、単量体も 2 量体もいずれも *Tm*-PRAI に有利になっている。さらに、水素結合およびイオン結合は両蛋白質で有意な差は見られなかった。酸性中で *Tm*-PRAI がより安定性が高いのは、ダイマー間の疎水性相互作用とキャビティの大きさの差によることが両者の立体構造の解析からわかった。¹¹⁾

7. 創薬化学への適用

病気の原因となる医薬の標的分子のほとんどは蛋白質である。例えばホルモンや神経伝達物質の受容体、特異的蛋白質分解酵素、細菌の細胞代謝や細胞壁形成などにかかわる酵素はみな蛋白質である。このような標的蛋白質に薬剤（低分子化合物）がどのように結合して蛋白質の機能を阻害するかを、複合体 X 線結晶構造解析やコンピュータモデリングより明らかにし、その構造情報を用いて医薬品候補化合物を探索する手法は **Structure-Based Drug Design (SBDD)** と呼ばれ、効率的・合理的に医薬品を探索する手法として注目されている。¹³⁾

SBDD では、複合体 X 線結晶構造解析により、実験的に標的蛋白質と化合物の結合様式を明らかにするのが理想であるが、標的蛋白質の立体構造が得られない場合や、多数の化合物について個々にどのように標的蛋白質に結合しているかを知りたい場合、コンピュータモデリングを用いて予測することが多い。この手法では、まず化合物が標的蛋白質の結合ポケット（例えば活性部位）に当てはまるかどうか、化合物をフィッティング（ドッキング）させて予測する。その予測結合様式を基に、化合物と標的蛋白質との結合の強さを推測し、多数の中から強い化合物を選択したり、さらに結合が強くなるように化合物をデザインしたりする。しかし、この標的蛋白質と化合物の結合の強さを見積もること（スコアリング）は非常に難しい。分子動力学 (MD) 計算などにより、1 つ 1 つの化合物について詳細にシミュレーションすることも可能であるが、SBDD においては多数の化合物を扱う必要があり、短時間で簡易的に結合の強さを予測することが要求される。

現在知られているスコア関数は、エネルギー計算から得られるものや、経験的なものなど多数存在する。Wang¹⁴⁾ らは、利用可能な 11 種のスコア関数 (PLP, F-Score, LigScore, DrugScore, LUDI, X-Score, AutoDock, PMF, G-Score, ChemScore, D-Score) を比較した。その結果、なかでも X-Score や DrugScore で比較的良好な結果が得られることがわかった。経験的スコア関数である X-Score¹⁵⁾ を例に挙げると、式 (8) で表されるように、阻害剤の結合の強さ (ΔG_{bind}) を、ファンデルワールス相互作用の寄与 (ΔG_{vdw})、水素結合の寄与 ($\Delta G_{\text{H-bond}}$)、ゆがみの寄与 ($\Delta G_{\text{deformation}}$)、疎水性

相互作用の寄与 ($\Delta G_{\text{hydrophobic}}$) の和と仮定し、200 種の蛋白質実験データから経験的に導いたスコア関数となっている。ここで ΔG_{bind} は実験的に得られた解離平衡係数 (pK_d) から算出した値を用いており、また $\Delta G_{\text{hydrophobic}}$ は ASA が指標に用いられている。

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{H-bond}} + \Delta G_{\text{deformation}} + \Delta G_{\text{hydrophobic}} + \Delta G_0 \quad (8)$$

スコア関数の中には無償で利用可能なものもあるが、一般的には有料である。しかし、例に挙げたような経験的スコア関数の決定法は、上述のように HL 変異型を用いて安定化因子の寄与を定量化した手法とよく似ている。そこで、蛋白質の安定化因子を定量的に見積もることができる上述のパラメータが利用できないかと考えた。

蛋白質の安定性がさまざまな因子によって変化すると同様に、化合物と蛋白質の結合の強さもさまざまな因子に影響され、代表的なものとして疎水性相互作用、水素結合、化合物のエントロピー変化が挙げられる。疎水性相互作用は、式 (2) と同様に ΔASA (結合による溶媒露出面積変化) を用いて記述できるが、化合物にはハロゲン原子が含まれる場合があるため、疎水性相互作用の寄与は、式 (9) のようにハロゲンの表面積も考慮する必要がある。

$$\Delta \Delta G_{\text{HP}} = \alpha' \Delta \Delta ASA_{\text{non-polar}} + \beta' \Delta \Delta ASA_{\text{polar}} + \gamma' \Delta \Delta ASA_{\text{halogen}} \quad (9)$$

また、蛋白質の安定性 ($\Delta \Delta G_{\text{exp}}$) に対応するものとしては、実験的に測定された pK_d などの値を用いるのが望ましいが、使用できるデータが限られるため、 IC_{50} 値 (結合親和性：蛋白質機能の 50 % が阻害される化合物濃度) を用いることにした。具体的には、複数の標的蛋白質に多数の化合物をコンピュータ上でドッキングさせ、予測結合様式から得られる ASA などの値と、実験的に得られた IC_{50} の値を用い、同様の手法で各因子のパラメータを最小自乗法で決定した。その結果、例えば α' , β' , γ' はそれぞれ 0.041, -0.004, 0.025 となり、得られたパラメータを用いて算出して結合が強いと予測される化合物のほうが、より強い阻害剤であるという傾向が見られている。興味深いことに、それらのパラメータは、HL 変異型から得られた値と非常によく似ていた。このことは安定化因子の寄与を定量的に見積もることができるになれば、そのまま蛋白質と化合物の強さを見積もるのにも利用できる可能性を示唆している。

標的蛋白質の機能を阻害する化合物の探索の例を上にしたが、薬として世に出ているものは化合物だけではない。蛋白質そのものや、抗体、ペプチドなども蛋白質医薬品として使用されている。しかし化合物（固形の薬剤）と異なり液体の薬剤である場合が多く、安定性を確保するのが難しい。一般的に冷蔵や冷凍保存しなければならない場

合が多いが、常温でも安定に保存できる蛋白質医薬品が求められている。現在でもアミノ酸置換によって常温で保存できる蛋白質医薬品は存在するが、蛋白質の安定性を定量的に見積もることができるようになれば、蛋白質の機能を維持したまま安定化させるデザインが容易に可能になり、蛋白質医薬品の開発にも貢献できると考えられる。

8. まとめ

述べてきたように、蛋白質立体構造を用い、その構造上の特性と関連させることにより、安定化因子の定量的評価が可能であることを示してきた。これらの結果は、好熱菌由来蛋白質の安定性メカニズムの解明や、ドラッグデザイン、蛋白質医薬品の開発など役立てられる。パラメータを用いて簡易的に算出したアミノ酸側鎖の安定性への寄与 ($\Delta\Delta G_{aa}$) を表7に示すが、¹⁶⁾ これらの値を用いれば、なお一層利用しやすいと考えられる。しかし、さらに詳細にさまざまな安定化因子の寄与を定量化するには、系統的で網羅的な変異型の立体構造/安定性のデータが非常に重要である。現状ではまだデータが豊富であるとは言えず、今回使用した変異型データも約100種に過ぎないが、オーダーが一桁上がればデータベースも充実したものになり、同様の手法を用いてさらに精度高く評価ができるようになると考えられる。先に述べたとおり、アミノ酸配列中に含まれている立体構造・機能に関する情報を解読するためにも、その立体構造を安定に維持させている因子について定量的に理解することが重要で、今後さらなる研究が必要である。

表7 各アミノ酸が安定性に及ぼす影響。¹⁶⁾ (Side-chain contribution to protein stability.)

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

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

文 献

- 1) C. N. Pace: *J. Mol. Biol.* **226**, 29 (1992).
- 2) P. L. Privalov and S. J. Gill: *Adv. Protein Chem.* **39**, 191 (1988).
- 3) K. Takano, K. Ogasahara, H. Kaneda, Y. Yamagata, S. Fujii, E. Kanaya, M. Kikuchi, M. Oobatake and K. Yutani: *J. Mol. Biol.* **254**, 62 (1995).
- 4) K. Takano, J. Funahashi, Y. Yamagata, S. Fujii and K. Yutani: *J. Mol. Biol.* **274**, 132 (1997).
- 5) K. Takano, Y. Yamagata and K. Yutani: *J. Mol. Biol.* **280**, 749 (1998).
- 6) J. Funahashi, K. Takano and K. Yutani: *Protein Eng.* **14**, 127 (2001).
- 7) K. Takano, K. Tsuchimori, Y. Yamagata and K. Yutani: *Biochemistry* **39**, 12375 (2000).
- 8) J. Funahashi, K. Takano, Y. Yamagata and K. Yutani: *J. Biol. Chem.* **277**, 21792 (2002).
- 9) M. Nakasako: *J. Mol. Biol.* **289**, 547 (1999).
- 10) Y. Yamagata, K. Ogasahara, Y. Hioki, S. J. Lee, A. Nakagawa, H. Nakamura, M. Ishida, S. Kuramitsu and K. Yutani: *J. Biol. Chem.* **276**, 11062 (2001).
- 11) J. Taka, K. Ogasahara, J. Jeyakanthan, N. Kunishima, C. Kuroishi, M. Sugahara, S. Yokoyama and K. Yutani: *J. Biochem.* **137**, 569 (2005).
- 12) C. C. Hyde, S. A. Ahmed, E. A. Paduaro, E. W. Miles and D. R. Davis: *J. Biol. Chem.* **263**, 17857 (1988).
- 13) D. B. Boyd: *Mod. Drug Disc.* **1**, 41 (1998).
- 14) R. Wang, Y. Lu and S. Wang: *J. Med. Chem.* **46**, 2287 (2003).
- 15) R. Wang, L. Lai and S. Wang: *J. Computer-Aided Mol. Des.* **16**, 11 (2002).
- 16) K. Takano and K. Yutani: *Protein Eng.* **14**, 525 (2001).

プロフィール

船橋 順 Jun FUNAHASHI
協和発酵工業(株) 医薬研究センター 創薬化学研究所
KYOWA HAKKO KOGYO Co., LTD. Pharmaceutical
Research Center, Medicinal Chemistry Research
Laboratories
〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188
1188 Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731, Japan
TEL. 055-989-2016, FAX. 055-986-7430
e-mail: jun.funahashi@kyowa.co.jp
最終学歴：大阪大学大学院理学研究科高分子科学
専攻博士課程修了
専門分野：生物物理学・分子モデリング

油谷克英 Katsuhide YUTANI
理化学研究所 播磨研究所
RIKEN Harima Institute
〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1
1-1-1 Kouto, Mikazuki-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-
5148, Japan
TEL. 079-58-2937, FAX. 079-58-2917
e-mail: yutani@spring8.or.jp
最終学歴：大阪大学理学部生物学科
専門分野：蛋白質物理化学