

題目 : Protein thermostabilization strategy by ion-ion interactions at temperatures of over 100 °C (100°C 以上の温度領域における静電相互作用によるタンパク質の熱安定化戦略)

超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 CutA1 (*PhCutA1*) タンパク質の熱安定性は顕著に高い (変性温度 $T_d=149^\circ\text{C}$)。本研究では、*PhCutA1* の高い安定性に果たす荷電性残基の役割を明らかにし、得られた知見を基に、大腸菌由来 CutA1 (*EcCutA1*; $T_d=90^\circ\text{C}$) の高安定化を再現した。

Chapter 1: General introduction (序論)

タンパク質は一般に熱に対して弱いため、その安定化機構の解明は、基礎研究から産業応用においても重要な課題である。生育温度が高い生物種に由来するタンパク質は熱に強いこと、そして荷電性残基の割合が高いことが知られている。そこで、静電相互作用の強化がタンパク質の熱安定化戦略において重要であると考えた。

本研究では、*PhCutA1* と *EcCutA1* をモデルタンパク質として、荷電性残基導入によるタンパク質の熱安定化機構の解明と応用を目指した。

Chapter 2: Role of charged residues in stabilization of *Pyrococcus horikoshii* CutA1 (*PhCutA1* の熱安定性における荷電性残基の役割)

PhCutA1 の荷電性残基と熱安定性の関係性を明らかにするために、荷電性残基を非荷電性残基に置換することで熱安定性がどのように変化するかを調べた。その結果、正荷電残基変異型の T_d は平均して 5°C 程度低下したが、負荷電残基変異型においては安定性の顕著な低下は見られなかった。そこで分子全体の静電相互作用エネルギーを計算したところ、*PhCutA1* (-159.3 kJ/mol) の方が *EcCutA1* (-9.7 kJ/mol) より高かった。したがって *PhCutA1* に含まれる多くの負電荷残基は、部分的に反発し個別の荷電性残基を欠損させても熱安定性は低下しないものの、分子全体の静電相互作用エネルギーを高くするために必要であると考えられる。

Chapter 3: Evaluation of salt bridges in CutA1 using molecular dynamic simulations (MD シミュレーションを用いた CutA1 におけるイオン結合の評価)

イオン結合を形成する荷電性残基は、その多くが分子表面に位置しており、水溶液中で揺れている。そのため、イオン結合を評価するためには、分子動力学 (MD: Molecular Dynamics) シミュレーションが有用である。そこで本研究では、計 6 通りの Force field を用いて *PhCutA1* の MD シミュレーションを 300K で 400ns 行った。その結果、個々の静電相互作用は見かけ上小さいが、多くの荷電残基による有利な相互作用が働いていることがわかった。

Chapter 4: Stabilization of *Escherichia coli* CutA1 by rational protein design (タンパク質の理論的デザインによる *EcCutA1* の安定化)

EcCutA1 の T_d を *PhCutA1* の T_d に近づけるための第一歩として、SPMP 法 (目的タンパク質の各アミノ酸部位に対して 20 種類全てのアミノ酸残基に置換した場合の安定化エネルギーの変化を予測するプログラム) を用いて熱安定性の改善を試みた。SPMP 法によって *EcCutA1* の不安定化に寄与するアミノ酸残基を選出し、熱安定化が期待されたアミノ酸残基への置換を行った。7 箇所の不安定化残基を選出して変異型の安定性を測定した結果、5 箇所の変異箇所が熱安定性が増加した。最も熱安定性が増加した変異型は、一残基置換体では S11A 変異型 ($T_d=106.4^\circ\text{C}$)、二重変異型では S11V/E61V 変異型 ($T_d=113.5^\circ\text{C}$)、三重変異型では S11V/E61V/Q73V ($T_d=116.5^\circ\text{C}$) であった。これらの結果は、SPMP 法が熱安定化を試みる際に非常に有用であることを示唆している。

Chapter 5: Stabilization of *Escherichia coli* CutA1 by introduction of charged residues (荷電性残基導入による *EcCutA1* の安定化)

前章で安定化した *EcCutA1* の S11V/E61V 変異型を鋳型として様々な荷電性残基導入変異型を作製した。6 個の荷電性残基を導入した (A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R) 変異型の T_d は 137°C であり、*EcCutA1* と比較して 47°C 上昇した。ここで pH を変化させて安定性を測定したところ、pH が低下するほど T_d が低くなった。したがって、変異型は静電相互作用によって安定化していることが確認できた。このことは、100°C 以上の高温条件下において、多くの荷電性残基導入によって形成される静電相互作用が熱安定性にとって重要であることを意味する。

Chapter 6: Stabilization of *Escherichia coli* CutA1 by ion-ion interactions (静電相互作用による *EcCutA1* の安定化)

前章で 100°C 以上の高温条件下において、荷電性残基導入による静電相互作用の増強がタンパク質の安定化に有効であることが明らかとなったので、さらなる変異導入を試みた。ここで有効な変異を選定するために、一残基変異型を網羅的に作製し、安定化した変異を組み合わせて多重変異型を設計した。最も熱安定性が上昇した変異型は 9 個の変異 (S11V/Q25R/A39D/S48K/E61V/H72K/S82K/Q87K/T88R/T101E/N108E) を含み、 $T_d=142^\circ\text{C}$ であった。これは、*EcCutA1* と比較して 52°C 上昇し、*PhCutA1* に近づく値である。

Chapter 7: Conclusions (総括と結論)

本研究では、*PhCutA1* の熱安定性を解析した結果、高温領域におけるタンパク質の熱安定性において、多くの荷電性残基による静電相互作用の重要性を明らかにした。さらに、常温生物由来 *EcCutA1* が変異導入によって実際に *PhCutA1* に匹敵する T_d を保持させることに成功した。本研究は、今まで未知の領域であった 100°C を超える高温領域において、タンパク質の安定化を試みる際に重要な知見を与えるものである。