



国立大学法人京都大学エネルギー理工学研究所
国立大学法人千葉大学理学研究科

膜タンパク質の理論的耐熱化法を開発

—熱安定化をもたらすアミノ酸置換を短時間で予測—

<概要>

京都大学エネルギー理工学研究所の木下正弘教授は、千葉大学大学院理学研究科の村田武士教授、安田賢司特任助教らと共同で、膜タンパク質を耐熱化させるアミノ酸置換を理論的に短時間で予測する手法を開発しました。膜タンパク質は生体膜内外の情報伝達に大切な役割を果たしており、創薬の標的として注目されています。本手法により、実験的に取り扱いが困難だった多くの創薬標的膜タンパク質を大量かつ安定に調製することが可能になります。得られた耐熱化置換体を用いることで直接的に阻害剤等をスクリーニングできるばかりでなく、X線結晶構造解析^{注1)}による立体構造決定が可能となり、今後の創薬研究に大きく貢献できる革新技術となることが期待されます。

本研究成果は、2016年4月16日に米国科学雑誌「The Journal of Physical Chemistry B」にオンラインで公開されました。

<研究の背景と経緯>

膜タンパク質は生体膜内外の情報伝達に大切な役割を果たしています。このため膜タンパク質は重要な創薬の標的であり、現在市販されている薬の約60%は膜タンパク質を標的としていることが知られています。膜タンパク質を安定かつ大量に調製できるようになれば、その機能の解明や薬のスクリーニング、X線結晶構造解析による立体構造決定が容易になります。しかし、膜タンパク質は一般に立体構造が崩れ易い（立体構造安定性が低い）ため取り扱いが難しく、大量調製が困難でした。そこで本研究では、膜タンパク質を耐熱化させ立体構造を崩れ難くするアミノ酸置換を理論的に予測する手法の開発に取り組みました。耐熱化させると、結晶化のために界面活性剤中に取り出すことなどの他の要因に対してもより安定になります。

<研究の内容>

タンパク質内のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換することで、タンパク質が耐熱化し得ることが知られていますが、どのアミノ酸を置換すれば良いかは自明ではありません。そのため、実験により試行錯誤を重ね耐熱化するアミノ酸置換体を探索する手法が行われ、多大な労力と時間が費やされています。試行錯誤で耐熱化に成功する確率は極めて低いのです。耐熱化するアミノ酸置換体を予測する手法が最近幾つか報告されましたが、「ごく限られた置換（例えば、アラニンへの置換）しか調べることができない；物理化学に基づかない経験的なものであり、耐熱化に成功してもその理由が不明である」などの欠点を有しており、もっと有効な手法の開発が望まれていました。

本研究で、我々は「生体膜を形成するリン脂質の炭化水素鎖集団の並進配置エントロピー（炭化水素鎖集団の到達可能な微視的状态数およびそれに起因する安定性の尺度）が膜タンパク質の熱安定性を決定づける最も重要な因子である」という全く新しい考え方を導入しました。そして、我々が明らかにしたアデノシンA2a受容体(A2aR)という膜タンパク質の結晶構造情報を用いて、1つのアミノ酸置換に伴う生体膜のエントロピーの利得（損失）を液体の統計力学理論と形態熱力学的アプローチの統合型方法論により計算しました（図-1）。計算を行った1アミノ酸置換体の構造は全部で約60000個にも及びましたが、我々の自由エネルギー関数は計算時間が構造1つ当たり約1秒と非常に高速であるため、短時間で計算を行うことができます。得られた計算結果から、特に耐熱化すると予測された2箇所のアミノ酸残基を選びました。そして実際に実験的に数種類のアミノ酸置換体を作製し、その熱安定性を評価しました。その結果、的中率はおおよそ80%を誇り、変性温度が7度近く上昇する耐熱化1置換体も見つかりました。12度上昇する2置換体も得られました。

<今後の展開>

立体構造が判明している膜タンパク質に対して本手法（耐熱化置換体の理論的予測）を適用した場合、極めて高い的中率で耐熱化置換体を創出できることが分かりました（国際特許申請中：特願2014-130560号；W02015/1991621A1）。また、構造未知の膜タンパク質に対しては、ホモロジーモデリング^{注2)}を用いて立体構造を予測し、本手法を適応させる研究を行っています。すでに多くの創薬標的膜タンパク質の耐熱化予測に成功しており、得られた耐熱化置換体を用いることで結晶構造解析に初めて成功した例も出てきています。今まで大量調製が難しかった多くの創薬標的膜タンパク質の生産が可能となり、精製標品を用いた薬剤探索や機能解析、構造解析が飛躍的に進展すると期待できます。そしてこれらの構造機能情報は多くの波及効果をもたらし、関連する生命機能や疾病原因の理解から医薬品開発までの我が国のライフサイエンスの推進に大きく貢献できると考えています。

<用語解説>

注1) X線結晶構造解析

解析対象のタンパク質を結晶化し、X線照射によって得られる回折データから、タンパク質の原子レベルでの立体構造を決定する手法。

注2) ホモロジーモデリング

アミノ酸配列の類似度(相同性)の高い構造既知タンパク質の立体構造を鋳型として、構造未知タンパク質の立体構造を予測する手法。

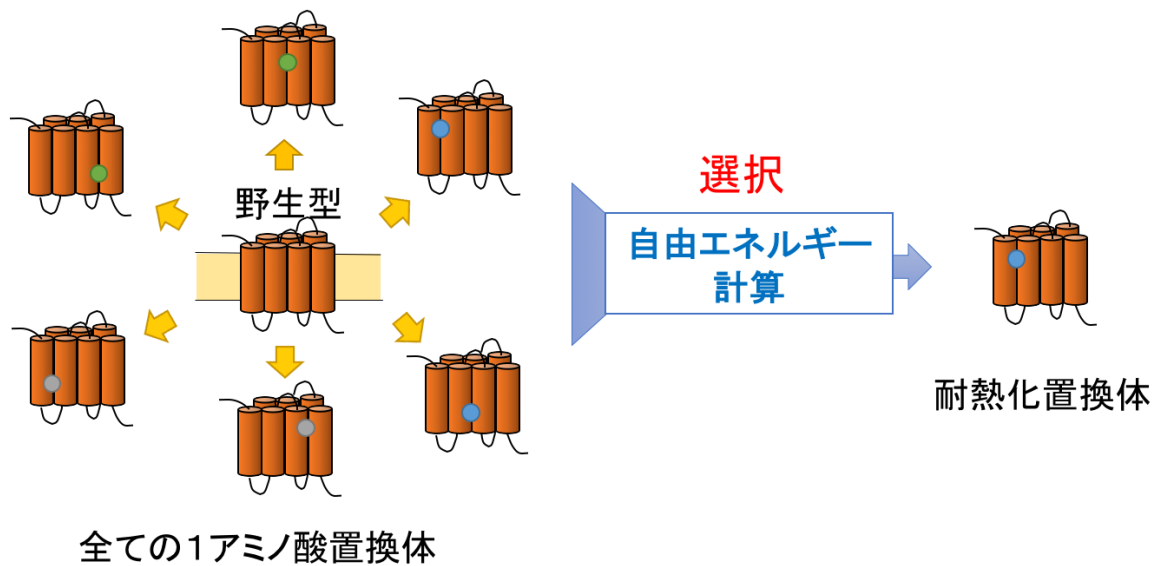


図-1 膜タンパク質の理論的耐熱化法の概念図

標的膜タンパク質の全ての1アミノ酸残基置換体を計算機内で発生させる。その全ての置換体構造の自由エネルギーを計算し、耐熱化置換体を予測する。

<論文名および著者名>

Identification of Thermostabilizing Mutations for Membrane Proteins: Rapid Method Based on Statistical Thermodynamics. *J. Phys. Chem. B*, 印刷中.

Satoshi Yasuda, Yuta Kajiwara, Yuuki Takamuku, Nanao Suzuki, *Takeshi Murata, and *Masahiro Kinoshita (*責任著者).