



## PRESS RELEASE

岡山大学記者クラブ

文部科学記者会

科学記者会

御中

令和 3 年 9 月 3 日

岡 山 大 学

# 水はタンパク質の立体構造を不安定化する ～長年信じられてきたタンパク質変性メカニズムの見直しへ～

### ◆発表のポイント

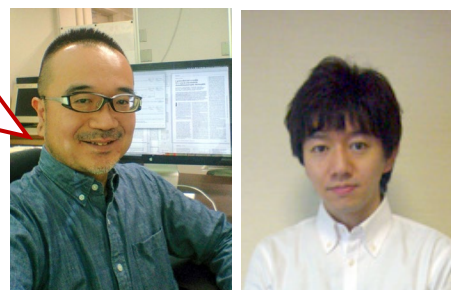
- ・これまでタンパク質の変性について「タンパク質は、それを構成する疎水基が水との接触を避ける様に立体構造を安定化する」と説明されてきました。
- ・長年信じられてきたこの「疎水性相互作用仮説」を、独自に開発した理論計算により検証しました。
- ・その結果、疎水基の水との接触はむしろタンパク質を不安定化（変性）させており、天然構造の安定性はタンパク質分子内に働く“直接相互作用”によることが明らかとなりました。

岡山大学異分野基礎科学研究所の墨智成准教授と立命館大学生命科学部応用化学科の今村比呂志助教は、独自に開発した理論計算を駆使して、これまで広く信じられてきたタンパク質の変性のメカニズム「疎水性相互作用仮説」の問題点を明らかにすると共に、その代替となる安定化メカニズムを提案しました。

タンパク質は体内で働く不可欠な分子であるという他に、近年は酵素やバイオ医薬品（例えば抗がん剤や新型コロナウイルスの治療薬など）として応用されています。タンパク質が働くためには規則正しい立体構造（天然構造（注1））が保たれている必要がありますが、この天然構造はそれほど安定ではなく、しばしば崩れ機能が失われます。これを変性といいます。タンパク質がどのようなメカニズムで変性するのか？これはタンパク質分子を応用する上でも重要な課題となってきました。現在の教科書には「タンパク質の天然構造は、それを構成する疎水基が水との接触を避ける様に、いわゆる“疎水効果”によって安定化する」と説明があります。

本研究ではこの仮説を理論的に検証すべく、液体の密度汎関数理論（注2）を適用して、水を介した間接的相互作用の寄与を計算しました。その結果、水は疎水基を露出させるように、すなわち天然構造をむしろ不安定化していることがわかりました。さらに、天然構造の安定性はタンパク質分子内に働く直接相互作用に起因することを明らかにしました。本研究成果は8月12日、タンパク質科学会誌「Protein Science」に掲載されました。

教科書を書き換える程の成果であり、結果には当初大変驚きました。この新しい学説が広まるまで少し時間がかかるかもしれませんが、基礎科学として重要な一歩です。抗体タンパク質をはじめとするバイオ医薬品は立体構造が不安定であると効果の低下や保存が難しくなるため、タンパク質を安定化させることは応用面でも非常に重要です。従来はタンパク質を安定化すると思われていた水の効果を見直すことは、タンパク質の改良技術の向上につながると考えています。



墨智教授

今村助教



## PRESS RELEASE

### ■発表内容

#### <現状>

近年出版された教科書も含め、生化学、分子生物学、タンパク質科学のどの教科書でも基本的に「タンパク質の天然構造（注1）は、それを構成する疎水基の水への露出を出来るだけ避けるように、いわゆる“疎水効果”によって安定化する」と説明しています（図1）。本仮説は Kauzmann [2] が1959年に提案した炭化水素移相モデル（注3, 図4）を基にした、非極性基（疎水基）間に働く水を介した間接的引力相互作用がタンパク質の立体構造を安定する主要因子であるとする学説を発端としています。本仮説はその後、多くの研究者を魅了し続け、1988年に大井-大島 [3] が、1995年に Makhatadze-Privalov [4] が提案した、大井-大島-Makhatadze-Privalov (OOMP) の計算方法（注4, 図5）によって、タンパク質分子内相互作用の重要性が見直されたものの「非極性基の水への露出は変性構造に対して不利に働く」とする疎水性相互作用仮説の本質は、依然として支持されてきました。

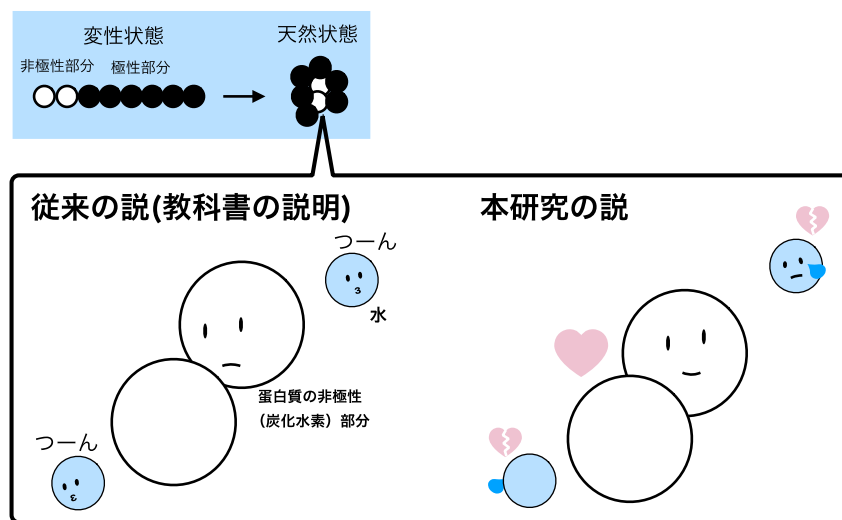


図1. タンパク質の安定化メカニズムのイメージ図。タンパク質は安定化すると変性しづらくなります。タンパク質は規則正しい立体構造（天然構造）を持つ状態と規則性が失われた変性構造の状態があります。タンパク質が働くためには、変性状態から天然状態へ変化する必要があります。タンパク質の非極性（炭化水素）部分は疎水基と呼ばれ、従来は疎水基が水を避けるように（水からしぼり出されるように[1]）集合する効果で天然構造が安定化されていると説明されてきました。しかし本研究で検証したところ、疎水基は水と相互作用していた方がエネルギー的に安定であり、疎水基が水を“嫌っている”という従来のイメージは誤りであることがわかりました。疎水基同士で働くファンデルワールス力が強いため、疎水基は水と相互作用するより、疎水基同士で集合します。疎水基が集合するという“見える”現象は同じだが、そのメカニズム（解釈）が異なるのがポイントです。尚、疎水相互作用は水の効果に加えて疎水基間のファンデルワールス力を含むと定義されていますが、水の効果に重点を置いた説明がなされることが多いです。



## PRESS RELEASE

### <研究成果の内容>

墨准教授および今村助教は、疎水性相互作用仮説を理論的に検証すべく、疎水効果によって安定化されるといわれるコイルドコイルヘリックス GCN4-p1 をモデルタンパク質として採用し、図 2 に示す熱力学的サイクルを適用し、液体の密度汎関数理論（注 2）を駆使して、ヘリックス二量体の解離に伴う水を介した間接的相互作用  $\Delta\mu^{\text{ex}}$  並びに、タンパク質上の全ての電荷を仮想的にゼロにすることにより得られる非極性相互作用による寄与  $\Delta\mu_{\text{nonpol}}^{\text{ex}}$  を計算しました。その結果、 $\Delta\mu^{\text{ex}}$  だけでなく、非極性基による寄与の上限  $\Delta\mu_{\text{nonpol}}^{\text{ex}}$ （図 2 説明文も参照）についても、ヘリックス解離に対して、むしろ有利に働くことが明らかとなりました。この結果は、従来の OOMP 法（注 4, 図 5）による予測と反対の結論を示しており、この矛盾は、OOMP 法で経験的に採用されている各官能基の寄与の水への露出表面積に基づく加成性に帰着することを見出しました。すなわち、露出表面積に基づく各残基の寄与の計算において、タンパク質内部に埋もれた残基による寄与は加算されておらず、結果としてその空孔形成エネルギーが考慮されていないために、埋もれた残基を数多く有する天然構造の安定性(ギブズエネルギー)を、常に過小評価するという理論的欠陥を明らかにしました（注 4）。疎水性相互作用仮説に代わる、本研究から導かれたタンパク質構造安定性のメカニズムは、以下の様にまとめられます（図 1）。

1. 水を介した間接的相互作用は、内部に埋もれた非極性基の水への露出による寄与も含め、タンパク質の変性構造に対して有利に働く。すなわち水はタンパク質の天然構造をむしろ不安定化している。
2. タンパク質分子内に働くファンデルワールス力などの直接相互作用は、水を介した間接的相互作用による不安定化に打ち勝ち、天然構造の安定化を導く。

### <社会的な意義>

本研究は、約 60 年もの間信じられてきた疎水性相互作用仮説に対する再考を強く示唆しています。これが一つのきっかけとなり、タンパク質の立体構造の安定性（＝変性のメカニズム）に関して、現実に即したシンプルで正しい理解へと向かって行くことが期待されます。加えて、水の新たな側面として、従来疎水性相互作用仮説でうたわれていたのとはむしろ逆の効果、すなわちタンパク質分子内相互作用によって固くコンパクトに折り畳まれた天然構造を、むしろほぐして柔軟に運動できる様にしており、水によって促される構造揺らぎは機能発現に対して多大なる影響を与えることが示唆されます。本研究成果は今後、バイオ医薬品の開発や人工タンパク質の分子設計の指針を与えてゆく、重要な知見であると言えます。

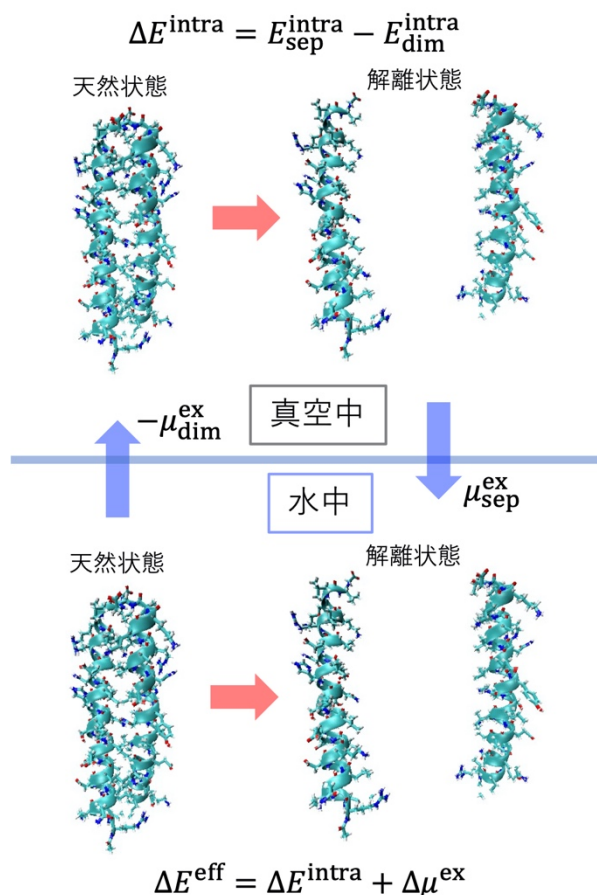


図 2. コイルドコイルヘリックス GCN4-p1 の水中での解離におけるエネルギー変化  $\Delta E^{\text{eff}}$  の、ヘリックス間直接相互作用による寄与  $\Delta E^{\text{intra}}$  および水を介した間接的相互作用  $\Delta \mu^{\text{ex}}$  への分割。これらに加え、タンパク質上の全ての電荷をゼロにした仮想的な非極性分子に対するエネルギー変化,  $\Delta E_{\text{nonpol}}^{\text{eff}}$ ,  $\Delta E_{\text{nonpol}}^{\text{intra}}$ ,  $\Delta \mu_{\text{nonpol}}^{\text{ex}}$  も合わせて計算しました。本計算から得られる水を介した間接的相互作用に対する非極性の寄与  $\Delta \mu_{\text{nonpol}}^{\text{ex}}$  は、非極性基からの寄与に加え、極性基を仮想的に電荷ゼロにした寄与も含むため、非極性相互作用による寄与の上限を与えると考えられます。

#### ■参考文献

1. 例えば D. Voet, J. Voet (田宮ら訳) (2012) ヴォート生化学 第4版, 東京化学同人.
2. Kauzmann W (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. Adv. Protein Chem. 14:1.
3. Ooi T, Oobatake M (1988) Effects of hydrated water on protein unfolding. J Biochem 103:114.
4. Makhatadze GI, Privalov PL (1995) Energetics of protein structure. Adv Protein Chem 47:307.
5. Sumi T, Mitsutake A, Maruyama Y (2015) A solvation-free-energy functional: a reference-modified density functional formulation. J. Comput. Chem. 36:1359.



## PRESS RELEASE

- Sumi T, Maruyama Y, Mitsutake A, Mochizuki K, Koga K (2018) Application of reference-modified density functional theory: Temperature and pressure dependences of solvation free energy. *J. Comput. Chem.* 39:202.
- Sumi T, Koga K (2019) Theoretical analysis on thermodynamic stability of chignolin. *Sci. Rep.* 9:5186.

### ■論文情報等

論文名： Water-Mediated Interactions Destabilize Proteins

掲載誌： *Protein Science*

著者： Tomonari Sumi, Hiroshi Imamura

DOI： 10.1002/pro.4168

発表論文はこちらからご確認いただけます。

URL: <https://doi.org/10.1002/pro.4168>

### ■研究資金

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金 (JP16K05657, JP18KK0151, JP20K05431, JP21K06503) の助成を受け実施しました。

### ■補足・用語説明

#### 注1：タンパク質の天然構造

タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合で繋がったポリペプチド鎖の構造を持ち、その結合順を一次構造と呼びます。一次構造に応じて、タンパク質は生体機能を発現する固有の立体構造を自発的に形成し、その規則正しい三次元構造を「天然構造」と呼びます。例えば、ロイシンジッパーと呼ばれるコイルドコイル構造を有する $\alpha$ ヘリックス二量体GCN4は、アミノ酸合成を制御する転写制御因子として機能し、DNA上のアミノ酸合成酵素遺伝子のプロモーター部分に結合します (図3)。

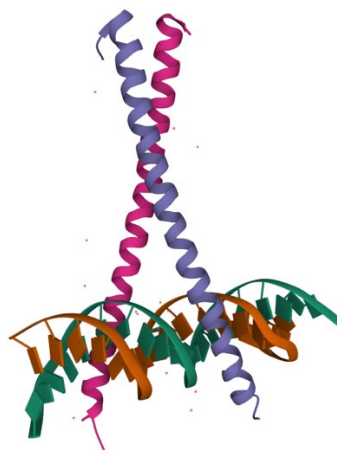


図3. ロイシンジッパーGCN4がヘリックス二量体間にDNAを挟み込んだ構造。





## PRESS RELEASE

### 注 2：液体の密度汎関数理論

密度汎関数理論は原子、分子、固体の電子状態への適用を始め、様々な液体・溶液系の理論としても適用可能な、極めて汎用性の高い不均一系の多体理論である。筆者らは全原子分子モデルに適用可能な液体の密度汎関数理論 Reference-modified density functional theory (RMDFT) [5,6] を提案し、数百個の有機分子に対する溶媒和自由エネルギーについて、実験値との平均絶対値誤差が1 kcal/molの精度で予測可能な、高精度でかつ高速な溶媒和自由エネルギー計算法を開発し、タンパク質構造安定性の解析に適用してきました [7]。

### 注 3：Kauzmann 炭化水素移相モデル

規則正しく折り畳まれたタンパク質の変性に伴い、タンパク質内部に埋もれていた非極性基が水へ露出する過程（図 4）に着目し、タンパク質の変性ギブズエネルギーを、非極性基がそれ自身による液体相あるいは適切な有機溶媒相（タンパク質内部環境）から水相へ移相する際の移相ギブズエネルギーによって模倣する、1959 年に Kauzmann が提案したモデル [2]。非極性基に対して得られる正の移相ギブズエネルギーから、水に浸された非極性基間には、水との接触を出来るだけ避ける様に水を介した引力相互作用が働き、それがタンパク質の天然構造安定性における主要因子であるとする「疎水性相互作用仮説」が提案されました。

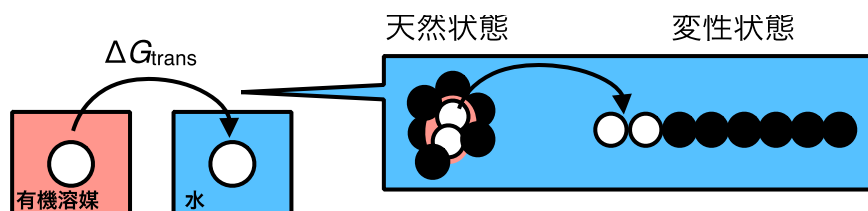


図 4. Kauzmann による炭化水素移相モデルとタンパク質の変性に伴う内部に埋もれた非極性基の水への露出との間のアナロジー。

### 注 4：大井-大島-Makhatadze-Privalov (OOMP) の方法

1988 年に大井-大島 [3]が、1995 年に Makhatadze-Privalov [4]が提案した、タンパク質の立体構造の安定性を解析するための方法。タンパク質の変性の熱力学サイクル（図 5 左上）に従い、変性ギブズエネルギーをタンパク質分子内相互作用による寄与と、水を介した間接的相互作用による寄与へと分割することが可能です。水を介した間接的相互作用の計算では、タンパク質全体の寄与を、それを構成する非極性基および極性基の水への露出表面積に比例した加減性に基づき算出します（図 5 左下）。この仮定に基づくと OOMP 法では、内部に埋もれた非極性基の水への露出が変性構造に対して常に不利に働くこととなります。そのため、炭化水素移相モデルから導かれた疎水性相互作用仮説の本質は、OOMP 法によっても引き続き支持されていました。しかし、OOMP 法ではタンパク質内部に埋もれた残基に対する正の空孔形成エネルギーが加算されていないため、埋もれた残基を多く含む折り畳まれた状態に対して、常に有利に働くという問題点が明らかとなりました。



PRESS RELEASE

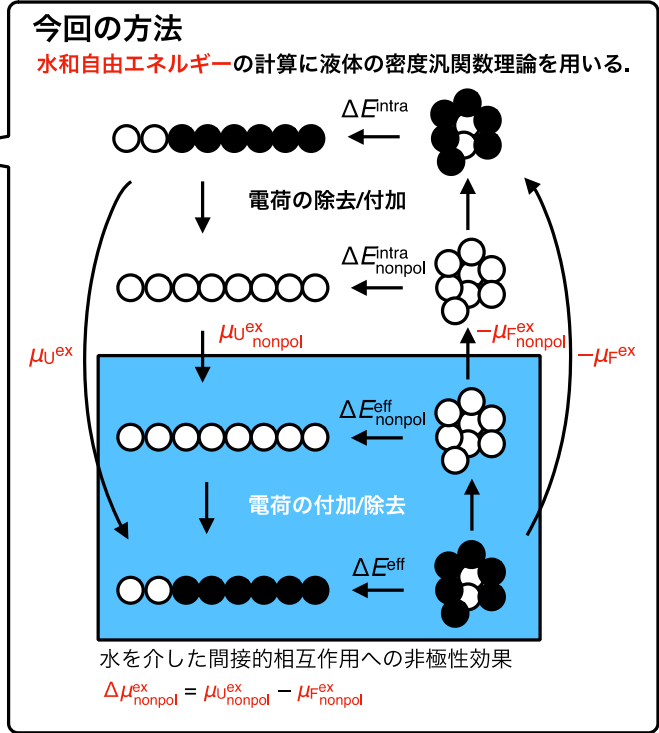
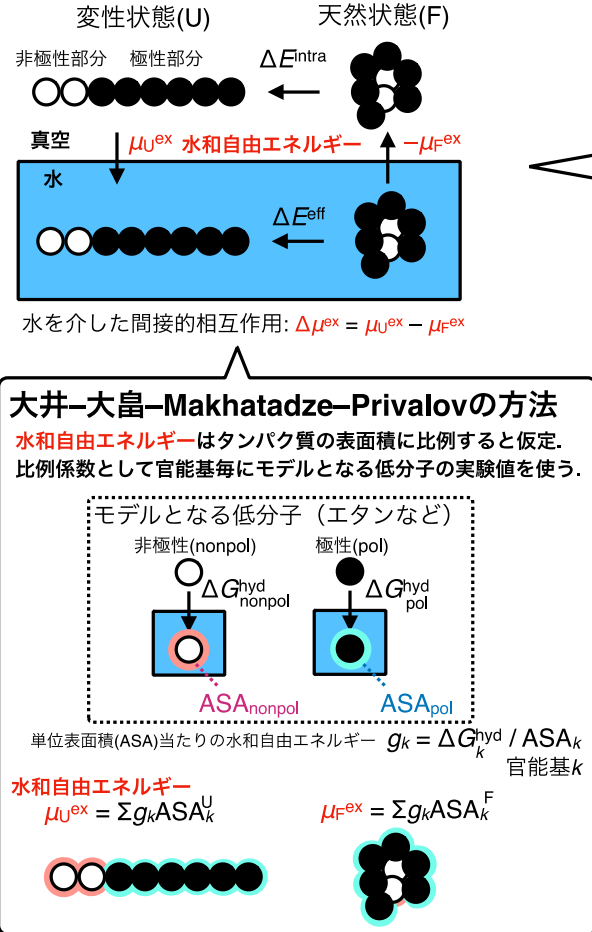


図5. タンパク質の変性の熱力学サイクルとその計算方法。大井-大島-Makhatadze-Privalov (OOMP) の方法では水和自由エネルギーをタンパク質の表面積に比例すると仮定し、比例係数として官能基毎にモデルとなる低分子の実験値を用いています。右に示すように本研究では水和自由エネルギーの計算に液体の密度汎関数理論を用いるため、上記のような仮定は入りません。

<お問い合わせ>  
岡山大学異分野基礎科学研究所  
准教授 墨 智成 (すみ ともなり)  
(電話番号) 086-251-7837



岡山大学は持続可能な開発目標 (SDGs) を支援しています。