

PRESS RELEASE

岡山大学記者クラブ、文部科学記者会、科学記者会、
兵庫県教育委員会記者クラブ、千葉県政記者クラブ、
長浜市記者クラブ

御中

令和5年9月27日
岡山大学
兵庫県立大学
千葉大学
長浜バイオ大学

タンパク質と水と共溶媒の「三角関係」を解く方法を考案 ～タンパク質医薬品の開発に必要な膨大な計算コストの効率化に貢献～

◆発表のポイント

- ・尿素やアルコールなどの共溶媒はタンパク質を変性させますが、その変性の分子メカニズムには不明な点が多く残されています。しかし、新しい共溶媒の開発は、たくさんの実験と検証を積み重ねた研究者の経験に頼る部分が多く、複数回の試行錯誤が必要なことが課題となっています。
- ・今回、タンパク質変性におけるタンパク質と水と共溶媒の「三角関係」を解く方法を考案しました。
- ・本研究で提案した解析法を用いることで、膨大な計算コストを必要としてきた共溶媒効果による構造安定性の評価の効率化に貢献することが期待されます。

岡山大学大学院自然科学研究科の中田乃愛 元大学院生（令和5年3月修士課程修了）、兵庫県立大学大学院情報科学研究科の岡本隆一 特任講師、岡山大学異分野基礎科学研究所の墨智成准教授 および甲賀研一郎教授、千葉大学大学院理学研究院の森田剛准教授、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の今村比呂志助教は、尿素やアルコールによるタンパク質の変性⁽¹⁾の分子メカニズムを、分子シミュレーションを活用したデータ解析により明らかにしました。

尿素はタンパク質の分離・抽出において必要な変性剤として用いられ、アルコールはタンパク質の働きのコントロールに活用されています。水に加えることで効果を発揮するこれらの添加物は共溶媒と呼ばれ、古くより利用されてきました。しかし、共溶媒効果の分子メカニズムは複雑で十分な理解に至っていません。今回の研究では、鍵となるタンパク質、水、共溶媒の三者の相互作用の「三角関係」を解く方法を考案しました。

その結果、尿素はタンパク質の壊れた構造を好んでそれとの直接相互作用により吸着し、変性を促進する一方、2,2,2-トリフルオロエタノール（アルコールの一種）は α ヘリックス構造に好んで直接相互作用することで、その周囲に集まり α ヘリックス構造の安定化を導くことがわかりました。また水はいつも共溶媒と協力しながら、変性を誘導していることも発見されました。

本研究は8月25日、タンパク質科学会誌「*Protein Science*」にオンライン掲載されました。

PRESS RELEASE

◆研究者からのひとこと

共溶媒効果を評価する式に、今回ちょっとした工夫を加えることで、これまではっきりしなかった「三角関係」を明確にできた時は、とてもスッキリしました。これで水が変性を誘導していることを初めて示せました。そして、タンパク質周りのアルコール分子の配向を解析した時には、大変驚きました。大きな疎水基を持つアルコールは、界面活性剤が油滴を取り囲む時と同様に、タンパク質周りに「ミセル様配向」を形成すると考えられていたからです。ところが解析プログラムを作成し計算してみたところ、むしろ「逆ミセル様配向」の傾向が得られたのです。タンパク質は油滴ほど疎水的ではなく、表面に露出した極性基との静電力による影響であることが新たにわかってきました。



墨 准教授

■発表内容

<現状>

私たちの体の中には、タンパク質という大切な分子がたくさんあります。これは、体を機能させるために欠かせないもので、その役割を果たすためには特定の形（立体構造）を保つ必要があります。しかし、タンパク質はデリケートな性質を持っており、しばしば構造が壊れてしまうことがあります。構造が壊れてしまうと、タンパク質は正常に機能できなくなります。

最近ではタンパク質を薬として使ったり工業生産に使ったりすることが多くなってきました。しかし、その際にタンパク質の構造が壊れてしまうと、うまく働かなくなります。そのため、タンパク質の構造を守るための「お助けアイテム」が考えられています。これはタンパク質が入っている溶液と一緒に入れる物質で、水と一緒に使うと良い働きをしてくれます。この物質を「共溶媒」と呼んでいます（図1）。これとは別のタイプの、あえてタンパク質を壊す共溶媒もあります。これは変性剤とも呼ばれ、タンパク質の機能をストップさせて化学的な処理をしたり、性質を調べたりするときに役立ちます。つまり、共溶媒は水に加えることでタンパク質の構造を自在にコントロールできる優れものといえます。

ただ、この共溶媒の効果がどうして起こるのか、まだ十分にわかっていないことが多く残されています。そのため、新しい共溶媒を開発する際には、多くの試行錯誤が必要なことが課題となっています。どの共溶媒が一番効果的なのかを見極めるために、たくさんの実験と検証が行われ、経験的に開発されているのが現状です。

PRESS RELEASE

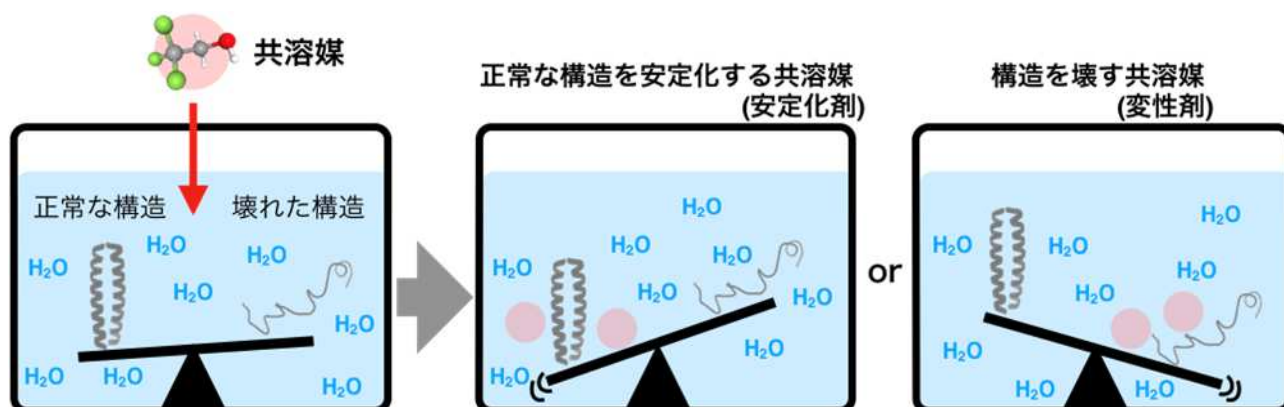


図 1. タンパク質の立体構造への共溶媒効果。タンパク質の正常な構造と壊れた構造は絶妙なバランスで保たれている。普通は正常な構造の方が、わずかに重みがある（比率が多くなる）ことをシーソーの絵で例えている。共溶媒によってどちらの構造に、どれくらいの重みがかかるかは共溶媒の種類によるが、その予測は困難である。

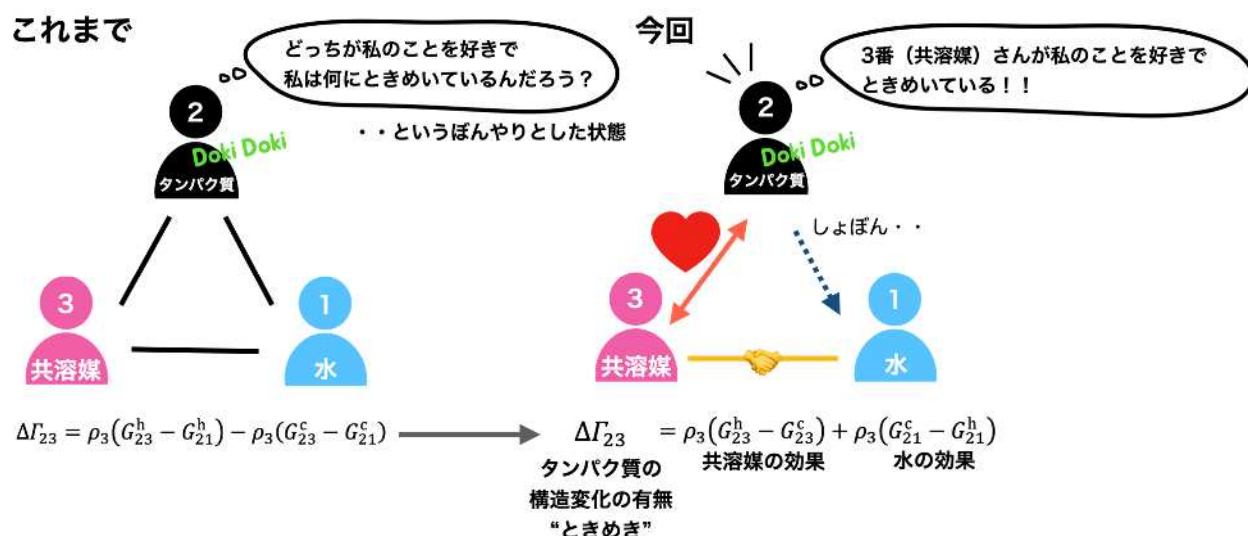


図 2. タンパク質と水と共溶媒の三角関係を解く方法の、アルコールの場合のイメージ。

<研究成果の概要>

水と共溶媒とタンパク質の三者の「三角関係」によって共溶媒効果は生まれます（図 2）。三者三様の相互作用（好き・嫌い）により、共溶媒効果である“ときめき”（ここではタンパク質の構造変化）が起こります。これまではこの三角関係におけるハート（♥）と“ときめき”（タンパク質の構造変化の比喩）の関係を描く方法がありませんでした。今回の提案した方法では、水と共溶媒がそれぞれどのくらい“ときめかせているのか”（タンパク質の構造変化を引き起こしているのか）を表すことができるようになり、「三角関係を解く」ことができるようになりました。

通常、水に共溶媒を入れたときのタンパク質の構造変化を観察するだけでは、お互いの関係は見えません。そこで、今回の研究では互いの相互作用（タンパク質-共溶媒、タンパク質-水）を

PRESS RELEASE

分子シミュレーションのデータから引き出しました。さらに、これがタンパク質構造変化前後でどう変わるかを計算しました。そうすることで、共溶媒によってタンパク質の構造が変わるのか、水によってタンパク質の構造が変わるのか判別することができるようになりました。

<研究成果の詳細>

共溶媒効果の典型例として今回の研究が取り上げたのが、尿素とアルコールの共溶媒効果です。尿素はコイル構造（壊れた構造）を誘導するのに対し、アルコールは α ヘリックス構造⁽²⁾を誘導することが良く知られています。しかしながら、その分子メカニズムについては現在も論議が続いています（参考文献 1、2）。

今回、モデルとして疎水コア付きの α ヘリックス構造タンパク質（GCN4-p1）を採用し、尿素水溶液と 2,2,2-トリフルオロエタノール（TFE）水溶液での分子シミュレーションと溶液理論（Kirkwood-Buff の理論と選択的結合理論）解析を実施することで選択的結合パラメータ（ Γ_{23} ）を計算しました。 Γ_{23} はタンパク質が共溶媒と水のいずれを好むかという指標です。これをタンパク質が α ヘリックス(h)構造のとき（ Γ_{23}^h ）とコイル(c)構造のとき（ Γ_{23}^c ）について、それぞれ計算しました。さらに、その差を過剰溶媒和量（ $\Delta\Gamma_{23}$ ）と定義して計算しました。

選択的結合理論より、 $\Delta\Gamma_{23}$ の値が正のときは共溶媒の添加に伴い α ヘリックス構造が誘導され、負のときはコイルが誘導されます。分子シミュレーションの結果を解析することにより、確かにそのようになっていることを確認しました。そこで、さらに私たちは $\Delta\Gamma_{23}$ の正負を決めている要因を解析し、尿素と TFE それぞれについて、以下を特定することができました。

1. 尿素とコイル構造の主鎖との直接相互作用が、 α ヘリックス構造の時より強いいため、 $\Delta\Gamma_{23}$ が負の値となり、尿素添加でコイル構造が誘導される。
2. TFE と α ヘリックス構造の側鎖との静電相互作用が、コイル構造の側鎖より強いいため、 $\Delta\Gamma_{23}$ が正の値となり、TFE 添加で α ヘリックス構造が誘導される。これまで TFE は疎水性的な CF_3 基がタンパク質方向へ向いたミセル様配向を取ると考えられてきたが、実際には OH 基をタンパク質へ向けた「逆ミセル様配向」により、側鎖との静電相互作用を強めている。
3. 水はいつもコイル構造を安定にしている。これは尿素水溶液でも TFE 水溶液でも共通している。コイル構造は α ヘリックス構造に比べ、水分子が侵入できない空孔が数多く存在することがこの原因となっている。

以上をまとめると、尿素と TFE の共溶媒効果の違いは共溶媒分子の化学的性質に応じたタンパク質との直接的相互作用の違いに起因することがわかりました。

今回の研究により、タンパク質の構造変化に対する共溶媒効果は、ある特定の構造に相互作用して構造変化を誘導する直接的相互作用の効果と、水和による変性誘導効果との和として与えられることが明らかとなりました。

<社会的な意義>

本研究で提案した解析法を用いれば、抗体などタンパク質医薬品の構造変化に対する共溶媒効果を、水溶液中のタンパク質の分子シミュレーションにより予測することができます。一般に分子シ

PRESS RELEASE

ミュレーション法を用いて構造安定性の違いを評価するには、自由エネルギー差を計算する必要がありますが、それには膨大な計算コストを必要とします。しかし、本手法を用いれば、自由エネルギー計算を直接行うことなく、共溶媒効果を予測することが可能であり、計算機上でのスクリーニング（インシリコスクリーニング）の効率化に貢献することが期待されます。

■参考文献

1. Yang Z, Xiu P, Shi B, Hua L, Zhou R. Coherent microscopic picture for urea-induced denaturation of proteins. *J Phys Chem B*. 2012;116: 8856–8862.
2. Ohgi H, Imamura H, Sumi T, Nishikawa K, Koga Y, Westh P, Morita T. Two different regimes in alcohol-induced coil-helix transition: effects of 2,2,2-trifluoroethanol on proteins being either independent of or enhanced by solvent structural fluctuations. *Phys Chem Chem Phys* 2021;23: 5760–5772.

■論文情報等

論文名： Molecular mechanism of the common and opposing co-solvent effects of fluorinated alcohol and urea on a coiled coil protein

掲載誌： *Protein Science*

著者： Noa Nakata, Ryuichi Okamoto, Tomonari Sumi, Kenichiro Koga, Takeshi Morita, and Hiroshi Imamura

DOI： 10.1002/pro.4763

発表論文はこちらからご確認いただけます。

URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.4763>

■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（JP20K05431, JP22H01888, JP21K06503）の助成を受け実施しました。

■補足・用語説明

（1）変性

タンパク質の正常な構造（天然構造）が壊れ、機能が失われることを変性といいます。アルコールによって天然構造にはない α ヘリックス構造が現れることもあります。これも変性の一種です。

PRESS RELEASE

(2) α ヘリックス構造

タンパク質の基本的な構造の一つ。アルコールの中でもフッ素アルコールは特に α ヘリックス構造を誘導する能力が高く、今回研究に用いたのもフッ素アルコールの一種（2,2,2-トリフルオロエタノール）です。

<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
（メール）sumi@okayama-u.ac.jp



岡山大学は持続可能な開発目標（SDGs）を支援しています。