

| 残基フラグメント構造データベースの構築とタンパク質熱安定性スコアリング |               |       |
|-------------------------------------|---------------|-------|
| 黒田 研究室                              | 学籍番号：06251047 | 都賀 友広 |

**【緒言】**

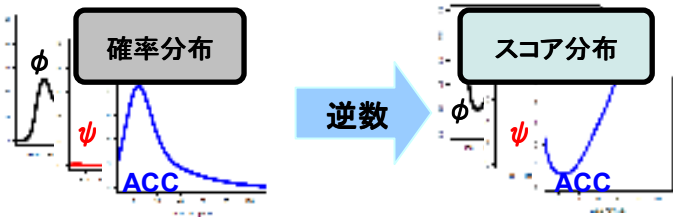
タンパク質の熱安定性はタンパク質を工学的産業的に応用する際の非常に重要な要素である。それゆえ、熱安定性の予測及び向上はタンパク質工学分野において大きな意味を持つ。現在、フラグメント（数残基のタンパク質断片）の持つ情報からタンパク質の最安定構造を予測できることがいくつかの研究で示されている。そこで、本研究では 3 残基フラグメントのデータベースを構築し、変異導入によるタンパク質の熱安定性変化予測を目的とする。

**【方法】**

PDB から代表タンパク質（X 線結晶構造のみ）を選出し、二次構造計算プログラム DSSP の結果出力を利用して 3 残基フラグメント中央残基の  $\phi$ ,  $\psi$ , ACC に関するデータを収集した。そのデータを基に各パラメータの確率分布データベースを構築した。ACC とは DSSP において算出される溶媒露出表面積のことである。そして、そのデータベースを基にした熱安定性スコアリングシステム（図 1）を開発し、BPTI、GFPuv、VanX という 3 種類のタンパク質について 1 及び 2 残基置換体（表 1）に対するスコアリングを行い、実験値  $T_m$  と比較した。変異体は LEaP（Amber）を使用して X 線結晶構造に残基置換を行って、作成した。それら置換体モデルに対して構造最適化計算はかけていない。また、スコアが大きくなればなるほど、熱安定性は低いと予測する。

表 1. 対象タンパク質

|      | 1 置換体                                | 2 置換体      |
|------|--------------------------------------|------------|
| BPTI | {14 番目 :A, G, V 38 番目 :A, G, V} の組合せ |            |
| GFP  | N139C                                | N139CY140F |
| VanX | R71A, E181A                          | C78AC157A  |



フラグメントスコア

$$= \phi \text{スコア} \times \psi \text{スコア} \times \text{ACCスコア}$$

図1. スコアリングシステムについて

**【結果】**

スコアと  $T_m$  の相関を調べた（下図 2）。BPTI では負の相関が確認でき、ほぼ全ての置換体で熱安定性変化を予測できたといえる。GFP では N139C の  $T_m$  低下は予測できたが、N139CY140F の  $T_m$  上昇は予測できなかった。VanX においては野生型と R71A の関係を除いて予測は成功している。

**【考察】**

本システムは結晶構造の  $\phi$ ,  $\psi$ , ACC に対する各フラグメントの統計的適合性をスコア化している。安定性予測に成功したタンパク質では、変異部位の局部的立体障害の解消及び発生がそれぞれ安定化及び不安定化の要因であると推測できる。逆に安定性予測に失敗したタンパク質では、局部的立体障害とは別の要因によって安定性が変動したものと考えられる。

本システムでは計算対象タンパク質の X 線結晶構造が必要となる。1 残基置換体や、離れた残基での 2 残基置換体はそのモデル結晶構造とほぼ同一の立体構造を維持していることで安定性予測が成功したのだと考えられる。反対に、連続 2 置換体では局部的な立体構造が変化した可能性が考えられ、それが予測失敗の原因であると推測される。

本研究によって 3 残基フラグメント単位のデータベースでタンパク質の熱安定性を予測できることが示唆された。今後、新規パラメータの導入や、スコア計算アルゴリズムの最適化、残基置換による立体構造変動の考慮などによる予測精度の向上が期待される。

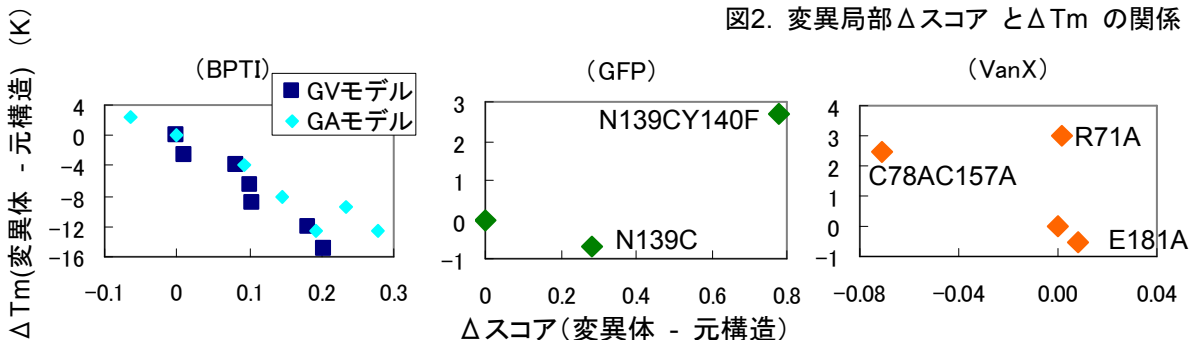


図2. 変異局部  $\Delta$ スコア と  $\Delta T_m$  の関係