

蛋白質の折り畳みダイナミクス：バルク観察からの知見と一分子観測の可能性

高橋 聡^{1,2} (st@protein.osaka-u.ac.jp) / 木下雅仁^{1,3} (kinoshi@protein.osaka-u.ac.jp)

¹阪大・蛋白研 / ²CREST・JST / ³京大院工・分子工学

はじめに

蛋白質は、変性した状態から機能をもつ状態に折り畳む能力を持つポリペプチドである。蛋白質が折り畳む過程では、ポリペプチド鎖がとりうる無数の構造の中から、唯一の折り畳み構造が短時間内に選ばれる。しかし、この構造選択を可能にする分子機構は理解されていない。そのため、蛋白質の構想予測や人工蛋白質のデザインなどの応用は、大変難しい課題である。特に、100残基よりも長い蛋白質の構造予測は現在でも困難だとされている。

折り畳んだ蛋白質の構造は、蛋白質の主鎖、側鎖、水の三者の間に働く様々な相互作用により安定化される。これらの相互作用は、折り畳んだ状態だけではなく、変性状態を含めた広大な構造空間にわたって蛋白質のポテンシャル曲面を組織化し、折り畳み構造の選択を可能にすると考えられる。従って、蛋白質が変性状態から折り畳み状態に変化する運動を観察し、ポテンシャル曲面の特徴を調べることで、蛋白質の折り畳みを可能にする分子機構についての理解が進むと期待される。

我々の研究グループでは、独自の装置開発を行うことで蛋白質の折り畳み運動についての実験的な研究を続けてきた。折り畳んだ蛋白質の構造の特徴として、二次構造を多く含むこと、コンパクトであること、構造が均一であることの三点を挙げることができる。従って、これらの特徴を観察することは、蛋白質らしさを決める本質的な情報を与えるはずである。また、運動の素過程を観察するためには、できるだけ速い時間分解観察が必要である。そのため、我々はサブミリ秒領域で二次構造とコンパクトさを観察するための装置開発を行った。また、折り畳み運動の不均一性を観測するための一分子観察手法も提案した。本稿では、我々がこれまでに得た知見について簡単な総括を行うとともに、一分子観察から今後得られると期待される情報について紹介する。

バルク観察からの知見

我々は、蛋白質の折り畳み途中に形成される中間体について、主鎖のコンパクトさと二次構造含量を時分割測定する研究を行った。実験対象として、ヘリックスを多く含むシトクロム c ^{1,2)} (104残基、cyt c) とアポミオグロビン³⁾ (153残基、apoMb)、ベータシートを含む一本鎖モネリン⁴⁾ (95残基、SMN) という二次構造含量の異なる三種類の蛋白質を選んだ。すると、

折り畳み初期の数百マイクロ秒以内に主鎖が収縮した中間体が形成され、次にミリ秒から数十ミリ秒の時間領域で二次構造と三次構造が組み上がる運動が共通して観察された。これらの観察から、我々は「収縮して探す (collapse and search)」という折り畳み機構を提案した⁴⁾。

我々の観察は、100残基以下の蛋白質で観察される二状態的な折り畳み運動とは質的に異なる。100残基以下の蛋白質の場合、折り畳み運動は広がった変性状態から折り畳み状態へ二状態的に起こり、バルクの実験で観察可能な中間体は存在しない。一方で、我々が観察した100残基以上の蛋白質の場合には、運動の初期にまず収縮が起こり、観察可能な中間体を作る。そのため、初期の収縮状態の特徴について強い興味を持たれる。仮に、収縮が一般的な高分子と同じく非特異的に起きるならば、収縮した状態では多くのミスフォールド構造が生じ、折り畳み運動は減速するはずである。しかし、実際の収縮状態から次の中間状態への構造変化は速く、数ミリ秒程度の時定数で起こる。この事実は、初期収縮運動に、極端なミスフォールド構造を避けるための何らかのメカニズムが備わっていることを示唆する。このメカニズムを推定する手がかりとして、初期収縮状態の性質について、我々がこれまでに得た情報を以下にまとめる。

初期収縮状態の二次構造は、円二色性 (CD) と赤外吸収 (IR) スペクトルから推定できる。cyt c¹⁾やSMN⁴⁾では、収縮状態と変性状態のCDスペクトルはよく似ており、収縮状態ではCDスペクトルで検出可能な二次構造はあまり作られないと結論できる。apoMbについてのCD観測の結果は、収縮状態でヘリックス含量が増加することを示したが³⁾、IR観測では、初期収縮状態は変性状態に近い二次構造を持つことが示された⁵⁾。CD分光法とIR分光法による結果をまとめて解釈すると、変性状態には短いヘリックス断片が多く存在しており、これらが連結して長いヘリックスを作る運動が収縮運動と同期したと考えられる⁵⁾。このように、初期収縮状態のポリペプチド主鎖の二次構造は変性状態と大きくは変わらないと思われる。

次に、初期収縮状態について、X線小角散乱観測による知見をまとめる。異なる蛋白質について得られた初期収縮状態の回転半径と、蛋白質の疎水性度や折り畳んだ構造での二次構造含量との関係を調べたが、有意な相関は見いだせなかった。しかし、残基数と回転半径には明らかな相関が存在し、貧溶媒中における疎水性高分子に期待される相関とほぼ一致した⁶⁾。この結果は、収縮状態が非特異的な構造を持つことを示唆している。一方で、SMNの収縮状態の全体的な形状は、特異的な構造形成を示した。すなわち、折り畳んだ状態で扁平な構造を持つSMNでは、X線小角散乱データの解析から初期収縮状態でも扁平な形状を持つことが示された⁴⁾。

初期収縮状態のポリペプチド鎖周囲の水和環境を、apoMbについてIR分光法を用いることで調べた⁵⁾。この結果、初期収縮状態の主鎖の周囲には水が多く存在することが明らかになった。これは、収縮したドメイン中にも、多くの水分子が取り残されることを示している。初

期収縮状態の回転半径が、折り畳み状態よりも大きいこともこの推論と一致する⁶⁾。

最後に、初期収縮状態の形成過程を調べた結果を紹介する⁷⁾。初期収縮の過程は非常に速く、従来の装置の100 μ s程度の時間分解能では直接観察が難しかった。我々は溶液混合装置の混合時間の短縮を試みていたが、最近になって混合時間を20 μ sまで短縮することに成功した。この装置を使ってcyt *c*の初期収縮を観察したところ、収縮は20 μ sの不感時間内に完了しており、収縮の時定数等を確定することはできなかった。このような高速運動は、特異的な構造形成よりも、非特異的な収縮運動と考えた方が理解しやすい。

以上の結果をまとめると、折り畳み初期の収縮過程には、高分子鎖としての性質による非特異的な収縮運動と、蛋白質らしい特異的な構造形成運動という両面の性質があると結論できる。このような収縮を説明するために、短距離の相互作用により変性状態に残されている部分構造が、非特異的に収縮する運動を考えることは容易だが、この運動モデルで、SMNで観察された扁平な全体構造を説明することは難しい。今後、折り畳みの初期収縮状態がもつ二面的な性質を説明できる運動モデルとそれを実証する実験を考える必要がある。

一分子観察の可能性

蛋白質の折り畳み運動は、多くの構造を持つ不均一な状態から唯一の構造を持つ状態に向けて起きるとされる。しかし、分子集団（バルク）の平均値を観測する従来の実験手法では、蛋白質の構造や運動の不均一性を検出することは難しかった。また、一分子レベルで、折り畳みのダイナミクスがどのように起こるのかを観測することもできなかった。我々は、新しい一分子観測手段を開発することで、折り畳み運動の不均一性を検証することを試みた。

従来の一分子観測法は、蛍光色素をラベルした蛋白質を光学基板に固定し、基板背面から蛍光色素をエバネッセント励起することでなされてきた。しかし、観測の時間分解能をミリ秒程度よりも短くできないことや、蛋白質を基板に固定した場合に、変性状態の蛋白質が大きな影響を受けるなどの問題点があるため、従来法を蛋白質の折り畳み観察に応用することは難しかった。そこで、蛍光ラベルした蛋白質分子がキャピラリーを流れる過程を、高感度の検出器でイメージングする手法を開発した。この手法により、溶液中の蛋白質分子の自由な運動を、サブミリ秒の時間分解能で観察することが可能になった。

開発した装置を使うことで、蛍光色素をラベルした cyt *c* 一分子の蛍光強度変化を観測した。得られたデータを検討すると、変性状態に対応する蛍光強度の強い状態 (U_1 状態) と、収縮した構造に対応する消光した状態 (N 状態) のほかに、中程度の蛍光強度を示す中間状態 (U_2 状態) が存在した。これらの状態の存在は、バルクの観察からも確認された。一分子の蛍光強度変化のデータには、さらに、これら三つの状態を分子ごとに異なる順番でジャンプする過程や、各状態内の副状態を細かくジャンプする過程も観察された。

得られたデータから折り畳み過程の不均一性を検討するために、蛍光強度の頻度分布がガウス分布を達成するまでに必要な時間を見積もった。すると、N 状態と U_2 状態ではガウス分布が比較的速く (2.5ms 以内) 達成されるのに対して、 U_1 状態ではガウス分布の達成に必要な時間が長く (30ms 以上)、多くの場合に状態内平衡が達成される前に U_2 状態へのジャンプが観察された。この結果は、折り畳みの初期運動は、異なる初期構造をもつ分子ごとに異なることを示唆する。

得られた一分子の時系列データには、繰り返し運動を示すように見える部分が含まれるなど、多くの情報が隠されているはずである。今後、より多くの情報を引き出すための実験手法の開発と、得られた時系列データを理解するための理論の開発が必要である。

文献

- 1) Akiyama, S., Takahashi, S., Ishimori, K. & Morishima, I. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 514-520.
- 2) Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Nishikawa, Y. & Fujisawa, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1329-1334.
- 3) Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. & Fujisawa, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 1171-1176.
- 4) Kimura, T., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Takahashi, S., Konno, T., Akiyama, S., & Fujisawa, T. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2748-2753.
- 5) Nishiguchi, S., Goto, Y., Takahashi, S. (2005) *manuscript in prep.*
- 6) Uzawa, T., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Ikeda-Saito, M., Takahashi, S., Akiyama, S., & Fujisawa, T. (2005) *manuscript in prep.*
- 7) Matsumoto, S., Yane, A., Goto, Y., Masaki, H., Fujita, M., Nakashima, S., & Takahashi, S. (2005) *manuscript in prep.*