

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570153

研究課題名(和文)

球状蛋白質のフォールディング自由エネルギー地形と中間体構造アンサンブルの探索

研究課題名(英文)

Exploring the free energy landscape of the folding and the intermediate ensemble of globular proteins.

研究代表者：

榎 互介 (MAKI KOSUKE)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30361570

研究成果の概要(和文)：球状蛋白質スタフィロコッカル・ヌクレアーゼ及びウマアポミオグロビンのフォールディングを速度論的手法と変異体解析を駆使して特徴付けた。スタフィロコッカル・ヌクレアーゼはフォールディング反応初期に特に $\beta$ -バレルドメイン内で顕著な凝縮が認められた。ウマアポミオグロビンは、反応開始後 100 マイクロ秒以内に中間体を蓄積し、更に逐次的に少なくとも二種類の間mediateを経て天然状態に至ることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The folding mechanisms of two globular proteins, staphylococcal nuclease and horse apomyoglobin, were investigated by using the ultrarapid mixing technique combined with the mutation analysis. Staphylococcal nuclease molecules were found to be already compact within the  $\beta$ -barrel domain several millisecond after the initiation of the folding reaction. Apomyoglobin accumulated at least one intermediate 100 microseconds after the initiation of the folding reaction, followed by the accumulation of at least two intermediate in the sequential pathway, before reaching the native state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質、フォールディング、速度論

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質のフォールディングは、生合成されたポリペプチド鎖が、蛋白質として生物学的機能を発揮するために必要不可欠な過程である。また、蛋白質分子レベルよりもスケールの大きな階層において起こる構造形成を可能ならしめるためにも蛋白質のフォールディングは必要不可欠なものである。従って、フォールディングはいわゆるセントラル・ドグマの最終段階として重要なものである。加えて、フォールディングは、熱・統計力学的な取り扱い、すなわち物理化学に基づいた理

解が可能である。生命現象を物理化学に基づいて理解するための第一歩として、蛋白質フォールディングの物理化学を理解することが必要不可欠である。

多くの蛋白質は、フォールディング反応の律速段階以前に、コンパクトな分子サイズ、天然様の二次構造をもつ中間体を蓄積する。特に過去の実験的研究から、これらフォールディング中間体は、蛋白質分子が効率的に天然状態へ至るために本質的であると考えられていた。一方、単純な蛋白質のモデル系を

用いた理論的研究などによると、蛋白質のフォールディングは理想的には漏斗型のエネルギー地形によって記述され、中間体の存在しない二状態的なフォールディングが本質的であるという結果が得られており、フォールディングにおける中間体の役割について疑問が投げかけられている。

フォールディング中間体の役割について、議論が起こるのは、特に二状態的なふるまいが本質的であるとする理論的研究については、蛋白質のモデルが比較的単純であるため、フォールディング反応の詳細を捉えづらいことに起因する。また、実験的な研究については、少数の例外を除いて中間体の構造的な特徴付けが、二次構造要素や分子サイズなどの分子全体の性質に基づいてなされている。しかし、中間体の構造・安定性についての分子論的な詳細については不明な点が多い。この様な観点から、フォールディング中間体の性質に関して詳細に検討し、中間体のフォールディング反応における役割を見出す。

## 2. 研究の目的

本研究の大局的な目標は、蛋白質のフォールディング自由エネルギー地形を実験の立場からできるだけ定量的に記述し、蛋白質のフォールディングの物理化学的機構を構造・エネルギー論の両面から理解することである。このため、分子サイズや二次構造要素をはじめ、構造の秩序形成が顕著なフォールディング反応初期に特に着目する。モデル蛋白質として、フォールディング研究でしばしば用いられているスタフィロコッカス・ヌクレアーゼ(SNase)やウマアポミオグロビン(apoMb)を用いる。速度論的手法を駆使するだけでなく、特にSNaseについては分子生物学的手法をも組み合わせて、フォールディング反応の初期から天然状態に至るまで、できるだけ曖昧さなく、かつできるだけ詳細に捉えることを目標とする。

フォールディング反応初期における秩序形成は、反応開始後サブミリ秒の時間スケールで起こる。モデル蛋白質のフォールディング反応を反応初期から天然状態に至るまで観測するために、反応開始後サブミリ秒から数十秒まで反応を実時間で観測する。この間に起こる構造形成をアミノ酸残基レベルの分解能で観測する。いくつかのアミノ酸残基の組について、それらの残基間距離がフォールディング反応に伴って変化する様子を探索する。これによって、反応に伴って蛋白質分子がどのように天然構造を獲得していくのかを、いくつかのアミノ酸残基間距離の変化によって追跡することができる。

SNaseも apoMb もフォールディング反応においてフォールディング中間体を蓄積する。従って、それぞれの中間体について、上記の様に構造形成の様子を特徴付け、更に変性剤濃度をはじめとして、実験条件を広く探索することによってそれぞれの中間体の安定性をも評価することができる。この様な解析を通して、これらモデル蛋白質のフォールディング反応について、時間・空間・エネルギー論を詳細に特徴付け、もって自由エネルギー地形を評価することによって、フォールディング機構とフォールディング中間体の役割を理解することを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの研究によって、蛍光連続フロー装置を組み上げ、その不感時間は約 0.1 ms である。この装置は、研究代表者が以前所属していた Fox Chase Cancer Center の Heinrich Roder 教授の研究室で開発されたもので、現在においても世界的に見て不感時間の最も短い溶液混合装置の一つである。本研究においては、蛍光連続フロー装置と市販のストップ・フロー装置とを組み合わせることによってフォールディング/アンフォールディング反応開始後サブミリ秒から数十秒間の速度論を観測した。また、平衡論的アンフォールディングを観測することによって、平衡条件下で蓄積する分子種を検討し、その構造と安定性とを特徴付けた。まず、フォールディングについてよく調べられている蛋白質として、apoMb を選び、その初期過程に着目してフォールディング速度論と平衡論を調べた。apoMb のフォールディング反応を、反応開始後 0.1 ms 程度から数十秒まで観測し、平衡論的アンフォールディングによって得られた結果と併せて、apoMb のフォールディング・スキームとそのエネルギー論を調べた。

SNase のアミノ酸残基間距離は、蛍光共鳴エネルギー移動を用いて評価した。ドナーとしてトリプトファン残基、アクセプターとして、5-チオ-2-ニトロ安息香酸(TNB)を用いた。SNase のフォールディングについての過去の研究によると、この蛋白質は、反応初期に $\beta$ -バレルドメイン内において顕著な構造形成が認められる。従って、反応初期に起こる構造形成を丹念に追跡するためには、 $\beta$ -バレルドメイン内でのアミノ酸残基間距離の変化を観測する必要がある。しかし、野生型蛋白質の唯一のトリプトファン残基(Trp140)は、フォールディング反応の律速段階で構造形成に関わる $\alpha$ -ヘリカルドメインの C 末端辺りに位置する。 $\beta$ -バレルドメイン内で起こる構造形成を直接観測するために、野生型蛋白質のトリプトフ

アン残基をヒスチジンに置換し(W140H)、 $\beta$ -バレルドメイン内の Phe76 をトリプトファン残基に置換する(F76W)二重変異を導入することによって、 $\beta$ -バレルドメインに唯一のトリプトファン残基 Trp76 をもつ単一トリプトファン変異体 Trp76 SNase を作成した。

Trp76 をドナーとし、構造形成に際してアミノ酸残基間距離に顕著な変化が予想される部位に TNB を導入した。興味ある部位にシステイン残基を導入し、システインのチオール基に TNB を修飾することによって SNase に TNB を導入した。本研究においては、 $\beta$ -バレルドメイン内に二カ所、 $\alpha$ -ヘリカルドメイン内に一カ所の合計三カ所に TNB を導入した。TNB 未修飾/修飾 Trp76 SNase 変異体の平衡論的アンフォールディングとフォールディング/アンフォールディング速度論を様々な尿素濃度において測定した。フォールディング反応において認められるそれぞれの分子種に対して、これらの三組のアミノ酸残基間距離を評価し、フォールディング反応に伴って SNase の構造形成がどの様に進むのかを評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) apoMb のフォールディング機構

apoMb のフォールディングを系統的に評価した。図 1 は、8 °C、pH 6.0 (12 mM クエン酸緩衝溶液)において、トリプトファンの蛍光を用いて観測した apoMb の尿素による平衡論的アンフォールディングを示す。

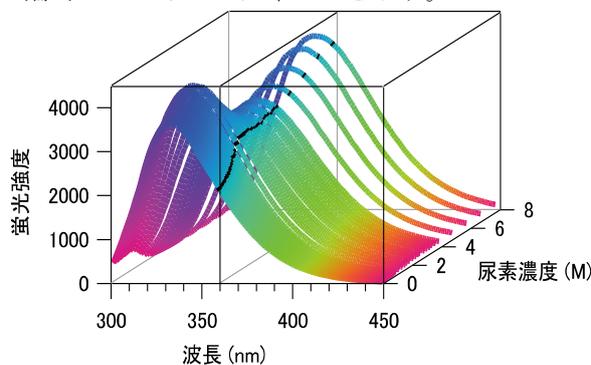


図 1. apoMb の尿素による平衡論的アンフォールディング

平衡論的アンフォールディングは、



の三状態モデルで解析した。但し、U、I、N はそれぞれほどけた状態、平衡論的中间体、天然状態である。I 状態は、pH 4 において蓄積するモルテン・グロビュール状態と極めて類似した分光学的性質を蛍光、円二色性に対して持つ。

apoMb のフォールディング速度論を蛍光連続フロー法を用いて測定した(図 2)。蛍光強度を反応のゼロ時刻に外挿したところ、始状態における蛍光強度とは異なった。これは、装置の不感時間(約 0.1 ms)内に中间体(I')が形成していることを強く示唆するものである。得られた反応曲線の時定数 $\tau_1$ は、約 0.1 ms であり、この過程で二つ目の中间体(I)が形成する。平衡論的中间体が充分蓄積する条件(~1.2 M 尿素)において、 $\tau_1$  以降に蛍光強度変化が見られないことから、中间体 I は、平衡論的中间体と同一であると考えられる。

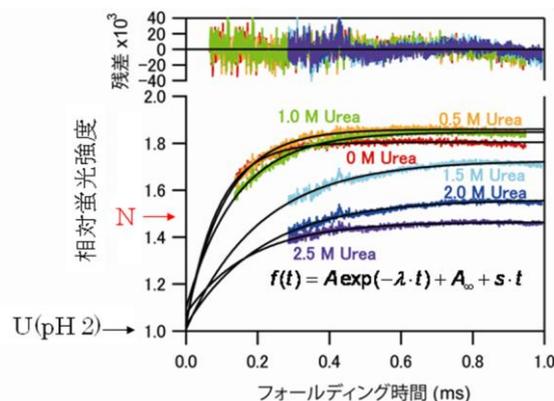


図 2. 蛍光連続フロー法で観測した 0 M から 2.5 M 尿素存在下における apoMb のフォールディング速度論。

さらにストップ・フロー法で反応開始後ミリ秒から数十秒までの時間領域でのフォールディング/アンフォールディング速度論を様々な尿素濃度において観測した。特にアンフォールディング速度論において、時定数の尿素濃度依存性に明かなロールオーバーが認められた。ロールオーバーは、天然状態がほどける際に越えるべき自由エネルギー障壁が二つあり、その様子が尿素濃度によって異なることを示す。さらに二つの障壁の間には、天然様中间体 M が存在する。この中间体 M は、常に不安定で安定に蓄積する条件は存在しない。これらのアンフォールディング/フォールディング速度論と平衡論的アンフォールディングの結果をまとめると、apoMb のフォールディングスキームは、以下のようになる。



ここで、I は平衡論的アンフォールディングにおいて穏和な条件下で蓄積する平衡論的中间体と同一である。それぞれの状態の安定性と、状態間の自由エネルギー障壁の高さを評価したものが、図 3 に示されている。apoMb のフォールディング機構の研究から得られた結論は、以下のようになる。

- ① apoMb のフォールディング反応は、上記後状態モデルで説明することができる。
- ② 連続フロー法の不感時間内に蓄積する中

間体 I が存在する。

③ フォールディング中間体 I は、平衡論的アンフォールディングで検出された平衡論的中间体と同一であることが強く示唆される。

④ 天然類似中间体 M が存在する。

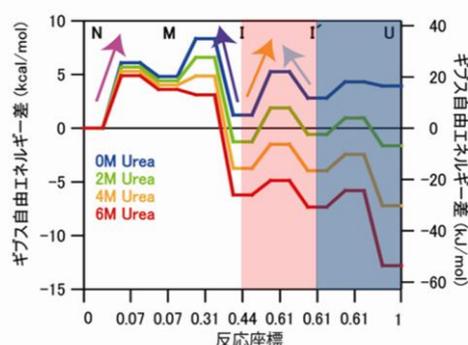


図 3. 各尿素濃度における apoMb の各状態(U、I、I、M 及び N)の安定性

(2) 蛍光共鳴エネルギー移動を用いて調べた SNase のフォールディング機構

Trp 残基と TNB との間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動を利用して、SNase のフォールディングをアミノ酸残基の分解能で評価した。TNB は、 $\beta$ -バレルドメイン内では Ser3 及び Lys45 に、 $\alpha$ -ヘリカルドメイン内では Gln123 にそれぞれ導入した。導入に際しては、それぞれの残基をシステインに置換し、単一システイン/単一トリプトファン変異体を作成した後、DTNB を用いて TNB 修飾を施した。NMR 構造に基づく、Phe76 と Ser3、Lys45 及び Gln123 との間の距離はそれぞれ 20.3 Å、29.6 Å 及び 16.7 Å であった(図 4)。Trp と TNB との  $R_0 = 24 - 30$  Å であるので、これらのアミノ酸残基間距離は適当である。さらにこれらの TNB 導入部位は、全て側鎖の大部分が溶媒に露出しており、側鎖の自由な回転を保證する。Trp76 は天然状態において側鎖が疎水領域に少なくとも一部埋まっているので、ドナー・アクセプター間のなす角に起因する因子  $\kappa^2$  からの影響がある。しかし、本研究ではこの寄与を無視して  $\kappa^2 = 2/3$  とした。得られた変異体をそれぞれ Trp76 /Cys3、Trp76 /Cys45、Trp76 /Cys123 SNase とよぶ。

それぞれの変異体に対して、全く同一の実験条件下で、TNB 修飾蛋白質と TNB 未修飾蛋白質について測定を行い、対応する蛍光強度を測定することによって蛍光共鳴エネルギー移動の効率を評価した。測定は、15°C、pH 5.3 (100 mM 酢酸ナトリウム)で行った。尿素による平衡論的アンフォールディングは apoMb と同様に三状態モデルを用いて解析した。アンフォールディング/フォールディ

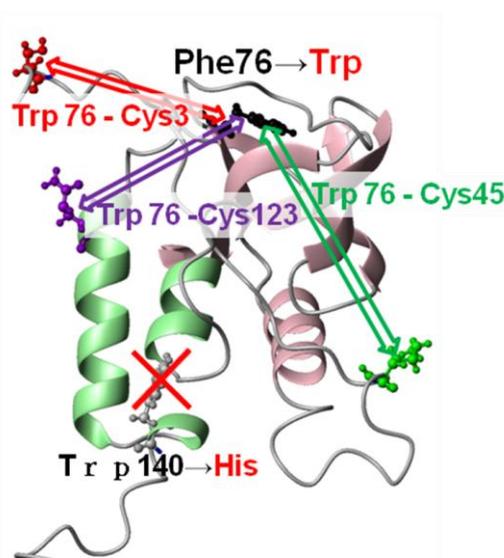


図 4. TNB 修飾 Trp76 のデザイン

ング速度論についても、速度論の尿素濃度依存性を評価し、ほどけた状態、フォールディング中間体、天然状態について、蛍光共鳴エネルギー移動効率を評価した。エネルギー移動効率を評価することによって、Trp-TNB 間距離を評価した。得られた結果を表 1 に示す。

表 1. 各々の状態における Trp-TNB 間距離

Trp76 / Cys3 SNase	N	I	U
$R(\text{FRET})(\text{速度論})(\text{\AA})$	24	30	31
$R(\text{FRET})(\text{平衡論})(\text{\AA})$	24	30	35
$R(\text{NMR 構造})(\text{\AA})$	20	-	-
$R(\text{ランダムコイル})(\text{\AA})$	-	-	47
Trp76 / Cys45 SNase	N	I	U
$R(\text{FRET})(\text{\AA})$	27	26	28
$R(\text{FRET})(\text{平衡論})(\text{\AA})$	28	28	29
$R(\text{NMR 構造})(\text{\AA})$	30	-	-
$R(\text{ランダムコイル})(\text{\AA})$	-	-	30
Trp76 / Cys123 SNase	N	I	U
$R(\text{FRET})(\text{\AA})$	25	28	30
$R(\text{FRET})(\text{平衡論})(\text{\AA})$	25	27	30
$R(\text{NMR 構造})(\text{\AA})$	17	-	-
$R(\text{ランダムコイル})(\text{\AA})$	-	-	37

表 1 から、SNase のフォールディングについて以下のことが示唆された。

① どの変異体もほどけた状態から天然状態へ至るに伴って、Trp-TNB 間距離は減少し、反応が進むにつれて分子がコンパクトになる。

② Trp76 / Cys 3 においては、ほどけた状態から中間体、中間体から天然状態へと反応が進むに伴い Trp-TNB 間距離が減少した。

③ Trp76 / Cys 123 においては、ほどけた状態から天然状態に至るまで Trp-TNB 間距離の減少が認められたが、中間体では顕著な距離の減少が認められなかった。

④ Trp76 / Cys 45 では、ほどけた状態から天然状態へ至るまでに、Trp-TNB 間距離に殆ど変化が認められなかった。

(3) 得られた成果の位置づけとインパクト、今後の展望

apoMb のフォールディング機構については、広く調べられているものの、反応初期過程については、未知の部分が残されていた。本研究は、apoMb のフォールディング初期過程の時間スケールを 0.1 ms 程度とそれ以下の過程として評価することができた。また、速度論的中間体と平衡論的中間体との一致を直接示すことができた。これらは、apoMb のフォールディング研究において、大きな前進であると考えられる。今後、構造的にもより詳細な情報を得ることができれば、これまでに知られている apoMb のフォールディング機構に加えて、より徹底的なフォールディングの描像が得られることが期待される。また、SNase のフォールディングについては、アミノ酸残基レベルでのフォールディングの記述に先鞭をつけることができた。蛍光共鳴エネルギー移動を用いた定量的な解析を行うためには、変異体のデザインにより多くの工夫が必要である。本研究で得られた成果は、現在論文としてまとめている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 水上 琢也、榎 互介、「ストップ・フロー法を用いた速度論測定」、蛋白質科学会アーカイブ、査読有、3、2010、e058

[学会発表] (計 8 件)

① 水上 琢也、榎 互介、"Multistate Folding Kinetics and Equilibrium of Horse Apomyoglobin."、第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20-22日、宮城県仙台市・東北大学

② 水上 琢也、榎 互介、"pH-Induced Folding and Unfolding of Apomyoglobin in the Submillisecond Time Range."、The 4th International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions、2010年11月30日-12月1日、滋賀県大津市・ピアザ近江

③ 榎 互介、「蛋白質のフォールディング研究：これまでの経路とこれからの地平」、第10回日本蛋白質科学会、2010年6月16-18日、北海道札幌市・札幌コンベンションセンター

④ 榎 互介、水上 琢也、"Folding of Apomyoglobin Explored by Ultrarapid Mixing Techniques."、2010 Indo-Japan Joint Workshop on "New Frontiers of Molecular Spectroscopy; From Gas Phase to Proteins"、2010年9月26-29日、兵庫県神戸市・ホテル北野プラザ六甲荘

⑤ 水上 拓也、榎 互介、"Folding of Apomyoglobin Studied by Rapid Mixing Methods."、The 3rd International Symposium on Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions、2009年12月20-21日、愛知県・名古屋大学

⑥ 鈴木 精一、榎 互介、「βバレル内にトリプトファンを導入したスタフィロコッカル・ヌクレアーゼ変異体のフォールディング」、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20-22日、熊本県・熊本全日空ホテルニュースカイ

⑦ 春日 康子、榎 互介、「スタフィロコッカル・ヌクレアーゼの単一トリプトファン変異体 (Trp66) のフォールディング」、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20-22日、熊本県・熊本全日空ホテルニュースカイ

⑧ 榎 互介、「スタフィロコッカル・ヌクレアーゼのフォールディング機構」、最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発利用プロジェクト・次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェア研究開発拠点：連続研究会「タンパク質機能(フォールディング)」、2009年3月30日、東京都文京区・東京医科歯科大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 互介 (MAKI KOSUKE)  
名古屋大学・理学研究科・准教授  
研究者番号：30361570

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし