

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 5日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570152

研究課題名（和文） 細胞内環境を模した共存分子密集状態・制約空間下におけるタンパク質の折畳みの研究

研究課題名（英文） Study of protein folding under crowding and confined-space condition that mimics intracellular environments

研究代表者

平井 光博（HIRAI MITSUHIRO）

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：00189820

研究成果の概要（和文）：

生体高分子の水和は、それらの構造安定性や機能に重要な役割を担っている。特にタンパク質の溶媒和は、折畳みなどのタンパク質の等温平衡状態や濃度依存的な効果の決定因子である。また、細胞内は様々な高分子により極めて混雑した環境にあり、タンパク質は共存分子混雑環境で機能する様に設計されている筈である。混雑環境はタンパク質の平衡状態を変化させることに疑いはないが、タンパク質の折り畳みに関する研究の大半が希薄溶液中で行われてきたために、混雑環境効果に関しては議論が錯綜している。本研究は、高分子量共存分子（ポリビニルピロリドン:PVP）存在下でのタンパク質の折畳み機構を明らかにする目的で実施した。PVPの存在は、タンパク質に浸透圧を負荷する。放射光X線広角散乱により、卵白リゾチームの変性・折畳みを検討した結果、浸透圧の上昇は、分子内構造の揺らぎの抑制を伴った水和シェル密度の変化や、熱変性過程における変性中間状態、所謂モルテングロビュール状態を安定化させることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Hydration of biological macromolecules plays an important role in their structural stability and functions. Solvation of proteins is the key determinant for isothermal, concentration-dependent effects on protein equilibria, such as folding. On the other hand, the interior of a cell is very crowded with various macromolecules, and proteins must be designed to function in environments crowded by co-solutes. There is no doubt that crowding environments change protein equilibria, however, interpretations of the effect of crowding remain controversial since structural studies of protein folding and stability were conducted in dilute solutions in many cases. This project was executed to clarify how a protein folds into its native structure under a crowding condition created by high-macromolecular-weight co-solutes (polyvinylpyrrolidone (PVP)). The presence of PVP affords osmotic pressure to proteins. By using wide-angle X-ray scattering, we have studied the effect of osmotic pressure on protein unfolding and refolding of hen egg-white lysozyme (HEWL). We have found that the increase of osmotic pressure induced a change of hydration-shell density accompanying a suppression of the intramolecular fluctuation and also stabilized the intermediate unfolded state, so-called a molten globule state in the thermal unfolding process at high osmotic pressure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造生物学，放射光 X 線広角散乱，階層構造解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のフォールディングや機能発現は、細胞内という制約された空間内のおよそ 350mg/ml (体積分率 30-40%) の高度に密集した分子環境で起きているが、タンパク質のフォールディングなどの研究の大部分は、希薄な水溶液で行われてきた。一方、円二色性などの分光測定法を用いた研究から、共存溶質分子の密集状態がタンパク質の構造安定性、ヘリックス・コイル転移などに影響を与えることが既に実験的に示されているが、タンパク質の 4 次・3 次構造、ドメイン構造から 2 次構造に至る全階層構造領域を同一試料・同一条件下の測定でカバーする実験研究は殆どなされておらず、そのため、共存溶質分子の密集状態での構造転移や変性・凝集過程の全体像が曖昧であり、共存溶質分子の影響とその熱力学的非理想性の解釈は論争的となっている。細胞内環境をモデル化した共存溶質分子が密集した制約空間内におけるタンパク質の平衡状態に関する研究は、上記のような学術的重要性を有している。

また、本研究は、近年盛んな生体脂質リポソームのドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用、例えば、身体内の特定の部位に医薬をデリバリーするための輸送手段、化粧品、遺伝子治療における利用、特定の菌類をターゲットとした高能率生育阻止剤などの開発と新規 DDS の創製とも密接に関係している。タンパク質を内包したリポソームサイズや安定性の制御、内包タンパク質の安定性などに関するナノスケールレベルでの構造物理的知見や基礎的研究が乏しいため、開発上の課題が残されている。一方、長年研究が行われてきた単純な細胞膜モデルとして脂質リポソームに関して、最近では、細胞反応系に近づけた各種酵素等を内包させた脂質リポソームの人工細胞としての研究が進展し、そのマイクロリアクターとしての応用も模索されており、共存溶質分子密集下の制約空間内におけるタンパク質の構造状態の研究は、産業応用の観点からも重要な意義を有している。

2. 研究の目的

高濃度の非荷電性共存溶質分子の存在は、単純には、表面アミノ酸残基の溶媒和の変化 (エントロピー変化) を通じて分子内の運動性を変化させ、希薄溶液中とは異なるタンパク質の平衡状態に移行させると同時に、排除空間に制約を受けるためタンパク質間相互作用も変化すると考えられる。そこで、本研究は、高度分子密集状態および制約空間 (リ

ポソーム) 内におけるタンパク質のフォールディング反応、凝集反応、構造安定性に関して、放射光 X 線広角散乱法などの構造物性手法を用いて研究を行い、分子密集環境下でのタンパク質の平衡状態の階層構造変化・凝集過程などの特性を明らかにする目的で実施された。

3. 研究の方法

主な研究方法は、広角 X 線散乱法と中性子逆コントラスト変化法 (重水素化法) を併用したタンパク質の階層構造およびリポソーム内部構造の解析である。また、FT-IR や蛍光光度測定 (蛍光プローブ法) によるタンパク質分子内の運動状態 (伸縮・変角運動) およびアミロイド凝集の解析、示差熱測定による熱力学緒量の評価、動的散乱による脂質リポソームの分散状態の解析などをそれぞれ用いた。

4. 研究成果

研究期間内に、高濃度共存溶質分子溶液中のタンパク質の平衡構造、フォールディング・アンフォールディング、アミロイド構造転移の研究、高濃度共存溶質分子存在下における脂質リポソームの構造転移の研究、及び、タンパク質封じ込め脂質リポソームの作製法の確立とその構造特性に関する研究を実施した。現在までに下記の成果を報告した。

●非荷電性共存溶質高分子が存在する浸透圧下におけるタンパク質の熱構造転移のアンフォールディング・リフォールディング過程に関して、階層構造依存性を検討し、タンパク質の水和状態の変化、変性の中間状態の安定化を見出した (*Thermochimica Acta*, 532, 15 (2012))。

●脂質ラフト成分を含有したモデル生体膜において、非荷電性共存溶質高分子の添加に伴う浸透圧の変化によって、可逆的なエンド/エキソサイトーシスと類似の構造転移が起きることを見出した (*J. Phys.*, 83, 012003 (2010))。

また、高濃度共存溶質分子存在下では、タンパク質のアミロイド構造転移が促進されること、タンパク質封じ込め脂質リポソームでは、構造転移温度が上昇することなどを見出した (現在投稿中)。

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 12 件)

1) M. Hirai, Y. Hagiwara, K. Takeuchi, R. Kimura, T. Onai, R. K. Hirai, N. Ohta, M. Sugiyama
Thermal unfolding and refolding of protein under osmotic pressure clarified by wide-angle X-ray scattering
Thermochimica Acta 532, 15 (2012). (査読有り)

2) M. Hirai, T. Takeuchi, R. Kimura, T. Iwasa, N. Watanabe, and N. Ohta
Resonant small- and wide-angle X-ray scattering (A-SWAXS) experiments of metallo proteins in solutions
SPRING-8 User Experiment Report, 2012A, 2012A1077 (2012). (査読無し)

3) 平井光博.
生体物質の小角散乱
日本中性子科学会誌, 22, 71(2012). (査読有り)

4) M. Hirai, T. Takeuchi, R. Kimura
Amyloid transition of proteins under crowding environment observed by WAXS
SPRING-8 User Experiment Report, 2012, 2012B, 2012B1095 (2012). (査読無し)

5) M. Hirai, R. Kimura, T. Takeuchi, T. Iwasa, and N. Watanabe
Study of Structural Stability of Protein Entrapped in Lipid Liposome
SPRING-8 User Experiment Report, 2011B, 2011B1574 (2011). (査読無し)

6) M. Hirai, T. Takeuchi, R. Kimura, M. Sugiyama, T. Iwasa, and N. Shimizu.
Effect of co-solute on protein structure at equilibrium
SPRING-8 User Experiment Report, 2011A, 2011A1923 (2011). (査読無し)

7) M. Hirai, R. Kimura, T. Takeuchi, M. Sugiyama, T. Iwasa, and N. Shimizu.
Characterization of structure of liposome occluding protein
SPRING-8 User Experiment Report, 2011A, 2011A1929 (2011). (査読無し)

8) M. Sugiyama, E. Kurimoto, H. Yagi, K. Mori, T. Fukunaga, M. Hirai, G. Zaccai, and K. Kato.
Kinetic Asymmetry of Subunit Exchange of Homooligomeric Protein as Revealed by Deuteration-Assisted Small-Angle Neutron Scattering.
Biophys. J., 101, 2037 (2010). (査読有り)

9) T. Onai, and M. Hirai.
Morphology transition of raft-model membrane induced by osmotic pressure: Formation of double-layered vesicle similar to an endo- and/or exocytosis
J. Phys. : Conference Series, 83, DOI1012003 (2010). (査読有り)

10) M. Hirai
Recent development and prospects of neutron scattering study of biomaterials mainly on biomembrane
J. Vac. Soc. Jpn. 53, 739 (2010). (査読有り)

11) M. Hirai, Y. Hagiwara, T. Onai
Effect of osmotic stress on protein folding
Photon Factory Activity Report, 27(A), 213 (2010). (査読無し)

12) M. Hirai, Y. Hagiwara, T. Onai, and N. Ohta
Thermal Unfolding and Refolding of Protein Under Osmotic Pressure
SPRING-8 User Experiment Report, 2010A, 2010B1452 (2010). (査読無し)

[学会発表] (計20件)

1) 木村亮太, 平井光博
タンパク質内包リボソームの浸透圧下における構造
第30回 PFシンポジウム, 2013.03.15 (つくば市)

2) 竹内一樹¹, 平井光博
Crowding 環境中のタンパク質構造の研究
第30回PFシンポジウム, 2013.03.15 (つくば市)

3) 平井光博
crowding 環境下におけるタンパク質および生体膜の構造と機能
第4回中性子小角散乱解析法研究会, 2013.3.13. (都内)

4) M. Hirai
Functional structure of raft-model membrane clarified by complementary use of neutron and X-ray
Symposium on Future and Challenges of Neutron Scattering in Biology: Structural Dynamics and Dynamical Structures, Grenoble, France, Oct. 3-5, 2012.

5) 平井光博
ラフトモデル膜とアミロイド蛋白質との相互作用
J-PARC プロジェクト課題「生体高分子の構造ーダイナミクス関連の解析」キックオフ会議, 2012.7.19. (東海村, J-PARC)

6) R. Kimura, M. Hirai
SWAXS study of thermal structural stability of liposomes entrapping proteins
日本生物物理学会第50回年会, 2012.9.23 (名古屋大学)

7) K. Takeuchi, M. Hirai
Effect of osmotic pressure on protein unfolding and cross-beta transition
日本生物物理学会第50回年会, 2012.9.23 (名古屋大学)

8) M. Hirai, K. Takeuchi, R. Kimura, N. Ohta
Development of resonant X-ray scattering method of metalloproteins in solutions
日本生物物理学会第50回年会, 2012.9.23 (名古屋大学)

9) S. Watanabe, M. Hirai, T. Iwasa
SAXS measurements of purified octopus rhodopsin
日本生物物理学会第50回年会, 2012.9.23 (名古屋大学)

10) 平井光博
タンパク質内包リポソームの構造と熱安定性
第29回 PF シンポジウム, 2012.03.15 (つくば市)

11) 平井光博
散乱法による脂質・蛋白質系の階層構造と機能解析
日本物理学会 2011 秋季大会, 2011.9.22 (富山大学)

12) M. Hirai
Structure and thermal stability of liposomes entrapping proteins
日本生物物理学会第49回年会, 2011.9.17 (兵庫県立大学)

13) 平井光博
軟 X 線を利用した共鳴 (異常) X 線小角散乱の可能性
合同 PF 研究会:「PF におけるマイクロビームを利用した XAFS, XRF, SAXS 実験の展望」
2011.9.7 (高エネルギー加速器研究機構)

14) 小内輝明, 平井光博
脂質混合リポソームの浸透圧に誘導される変形とその可逆性
合同 PF 研究会:「PF におけるマイクロビームを利用した XAFS, XRF, SAXS 実験の展望」
2011.9.7 (高エネルギー加速器研究機構)

15) 奥田浩司, 平井光博, 他
軟 X 線領域における GISAXS 法
合同 PF 研究会:「PF におけるマイクロビームを利用した XAFS, XRF, SAXS 実験の展望」
2011.9.7 (高エネルギー加速器研究機構)

16) M. Hirai, Y. Hagiwara, T. Onai, R. K-Hirai, and N. Ohta
Thermal Folding and unfolding of protein under osmotic pressure
21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics, 2010, July 31 (つくば市)

17) M. Hirai
Morphology transition of raft-model membrane under osmotic pressure
JST ERATO and CREST Joint Symposium, Future Trend in Softmaterial Research with Advanced Light Source, 2010, September 2 (兵庫, SPring-8)

18) 平井光博
ラフトモデル膜の機能構造
第59回高分子討論会, 2010.9.15 (北海道大学)

19) 平井光博
パルス中性子散乱を用いたタンパク質・生体膜の階層構造研究の展望
第48回日本生物物理学会年会, 2010.9.21 (東北大学)

20) 平井光博
脂質・タンパク質系の放射光 X 線・中性子散乱利用の有効性と展望
第10回ヘルスケア研究会, 2010.12.22 (都内)

〔図書〕 (計1件)

M. Hirai
Contrast variation in 'Neutrons in Soft Matters', John Wiley & Sons, 2011

〔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

平井 光博 (HIRAI MITSUHIRO)
群馬大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 00189820

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)