

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570181

研究課題名(和文) 物理化学に基づく球状蛋白質の動態解析

研究課題名(英文) Physical Chemical Analysis of conformational dynamics of globular proteins

研究代表者

横 互介 (Maki, Kosuke)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30361570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、蛋白質のフォールディングエネルギー地形を、実験の立場から定量的に記述し、蛋白質が天然状態へたどり着く機構を理解することである。スタフィロコッカル・ヌクレアーゼについて、蛍光共鳴エネルギー移動と超高速混合法とを組み合わせ、反応初期に非一様な構造形成が起こることを見いだした。これは初期中間体形成が特異的な相互作用に起因することを示唆する。アポミオグロビンについて、フォールディング反応初期に蓄積する中間体が平衡条件下において蓄積する中間体と同じ速度過程で形成することを見いだした。この結果は、これらの中間体が同一の分子種であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The specific aim of this study is to understand the mechanisms of protein folding in terms of physical chemistry, by quantitatively representing the structural and energetic characteristics of relevant species. Nonuniform chain collapse was observed in the early folding of staphylococcal nuclease by using ultrarapid mixing methods combined with fluorescence resonance energy transfer, indicating that specific interactions play a major role in forming early folding intermediates. A systematic study on urea-induced folding of apomyoglobin, using ultrarapid mixing methods, revealed that an ensemble of folding intermediates, which transiently accumulates during folding under strongly native conditions, is formed by the same kinetics as the equilibrium intermediate, which stably populated at equilibrium under moderately denaturing conditions, indicating that these molecular species consist of a single molecular species.

研究分野：生物物理学

キーワード：フォールディング 蛋白質 構造形成

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、細胞を構成する主要素の一つであり、生命活動の現場に必要な不可欠である。蛋白質分子は、生合成された後、適切にフォールディングすることによって、固有のかたちや動きを獲得し、機能を発揮する。この意味で、フォールディングは、遺伝暗号から生物学的機能への情報変換の最終段階である。また、蛋白質分子が正しくフォールディングして、初めてより高次の構造形成や蛋白質間ネットワークの形成が可能になる。従って、フォールディングは、生命現象における自己組織化の最も要素化された単位の一つであると捉えることができる。加えて、フォールディングは、熱力学・統計物理学を用いて記述できる現象であり、その意味で物質科学としての側面も持つ。生命現象を理解するためには、生命科学と物質科学との境界に位置する蛋白質フォールディングの物理化学を解明することが必要不可欠である。

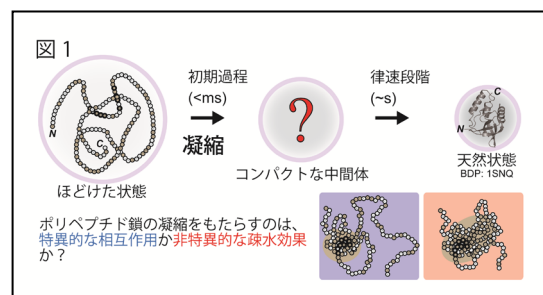
蛋白質の多くは、天然構造に至るまでの律速段階以前に、コンパクトな平均分子サイズ、天然様二次構造を持つ中間体を蓄積する。これまでの実験的研究においては、(1) フォールディングは、経路に沿った反応として記述され、(2) その経路上には中間体が蓄積し、これら中間体の蓄積は蛋白質分子の効率的なフォールディングに本質的であると考えられてきた。しかしながら、フォールディング反応で実際に起こっている現象は、自由エネルギー的に不安定で、構造的に著しく多様な構造アンサンブルが、特異的な立体構造をもつ天然状態へと至るといえるものである。しかるに、現在のフォールディングの実験的研究は、ほとんどの場合、二次構造含量や分子サイズと言った少数の構造パラメータをプローブとした速度論的手法を用いているので、反応過程で蓄積する構造アンサンブルについて平均像のごく一部の特徴しか捉えることができない。フォールディングの物理学を理解するためには、より詳細にフォールディング反応を記述することが必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究の目標は、蛋白質のフォールディングエネルギー地形を、実験の立場から定量的に記述し、蛋白質が天然状態へたどり着く機構を理解することである。上記目標に到達するためには、(1) フォールディング反応の初期から天然状態に至るまでの過程をできるだけ曖昧さなく、かつ詳細に観測し、(2) フォールディング反応に関わる分子種の構造と安定性を特徴付けることによって、フォールディングに際して天然構造が獲得されていく機構と、構造形成に伴う天然状態の安定化機構を明らかにする。

このような観点から、本研究では、モデル蛋

白質として、スタフィロコッカル・ヌクレアーゼ(SNase)とウマアポミオグロビン(apoMb)を用いる。SNaseもapoMbもフォールディング反応初期から後期にかけて複数の中間体を蓄積することが知られている。特に、いずれの蛋白質についても、初中間体は、反応開始後サブミリ秒の時間スケールで形成される。SNaseについて、中間体の平均構造を、アミノ酸残基間距離などの部位特異的な構造パラメータを用いて評価し、また、フォールディング自由エネルギー地形を反応初期から天然状態に至るまで記述することによって、そのフォールディング機構の理解を目指す。特に、中間体形成が特異的な相互作用に起因するのか、非特異的な疎水的凝縮に起因するのかを明らかにする(図1)。また、フォールディングにおける中間体の役割を明らかにする。



ApoMbについても、反応初期から天然状態に至るまでの構造形成に関わる自由エネルギー地形を記述し、さらに平衡条件下で蓄積する中間体とフォールディング中間体とを比較することによって、この蛋白質のフォールディング機構と中間体の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

フォールディング反応初期、反応開始後サブミリ秒の時間域において形成する中間体を直接観測するために、不感時間が0.1ミリ秒以下である超高速混合連続フロー装置を用いた。この装置は、申請者が所属していたHeinrich Roder教授の研究室で開発されたものであり、現在においても世界的に見ても不感時間の短い溶液混合装置の一つである。本研究においては、連続フロー装置とストップ・フロー装置を組み合わせることにより、反応開始後サブミリ秒から約100秒までの速度論を観測した(図2)。速度論に加えて、平衡条件下におけるアンフォールディングを観測することによって、平衡条件下での蛋白質の構造と安定性を評価し、速度論との対応をつけた。

SNaseの中間体構造を特徴付けるために、分子内の一次配列上離れた二つのアミノ酸残基間の距離に着目した。詳細な距離情報を得るために、単一トリプトファン(単一-Trp)変異体とN-(ヨードアセチル)-N'-(5-スルホ-1-ナフチル)-1,2-エタンジアミン(IAEDANS)や5-チ



(W140-C64-TNB)は、反応の律速段階において初めて認められる。この結果は、SNase のフォールディングにおいて、①  $\beta$ バレルドメインがサブミリ秒の時間域、中間体 I<sub>1</sub>において殆ど天然様のコンパクトさを獲得する、②ドメイン間のドッキングは天然状態の獲得に伴って起こる、③ 中間体形成に主要な相互作用は、特異的な相互作用である、ことを示唆する。

## (2) ApoMb のフォールディング機構

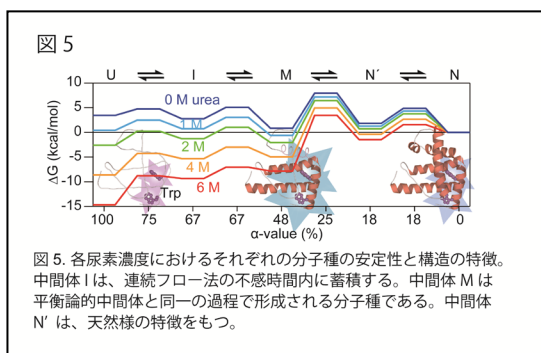
尿素および pH による apoMb のフォールディング機構を系統的に調べた。pH 6.0 において、尿素によるフォールディング・アンフォールディング速度論、平衡論的アンフォールディングをトリプトファン(Trp)の蛍光を用いて観測した。pH によるフォールディング・アンフォールディング速度論、平衡論的アンフォールディングについても同様の測定を行った。どちらの変性についても、平衡条件下においては三状態モデル



で解析を行い、速度論については五状態モデル



を用いて解析した。尿素によるフォールディングに関して得られた結果を図 5 にまとめる。



以下の結論が得られた。

- ① apoMb のフォールディング反応は、逐次五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のフォールディングで蓄積する中間体 I が存在する。
- ③ フォールディング中間体 M 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の速度過程で形成される。この結果はさらに、M と平衡論的中间体とが同一の分子種であることを強く示唆する。
- ④ 天然類似中間体 N' が存在する。

## (3) 得られた成果の位置づけとインパクト、今後の展望

これまで蛋白質フォールディングにおける初期中間体形成機構についての理解は限定的であった。その主たる理由は、フォールディング速度論の観測において、時間分解能が

充分でなかったことである。本研究においては、連続フロー法を用いることによって観測の時間分解能が向上した。SNase のフォールディングについては、以前にも単一 Trp 変異体を用いた研究によって、反応初期に形成される構造について限定的な知見があったものの、その構造形成の詳細については分かっていなかった。本研究によって、サブミリ秒の時間域で起こる中間体形成が、主として  $\beta$ バレルドメイン内での特異的な相互作用に基づくことが明らかになった。

ApoMb のフォールディングについては、速度論的中间体と平衡論的中间体とが構造上極めて類似していることは明らかになってきたものの、これらの中间体が蓄積する条件や形成の様式(過渡的な形成と平衡条件下での蓄積)が著しく異なるのかについては分かっていなかった。本研究では、これらの中间体の形成過程を直接観測することによって、これらの中间体が速度論的にも同一の分子種であることが明らかになった。さらに、これまで知られていなかったフォールディング及びアンフォールディング反応初期に蓄積する中间体を見いだした。

ふたつの研究に共通する特徴は、サブミリ秒の時間域における構造形成を直接観測したことである。この時間域で起こる構造形成が比較的大規模であることから、フォールディング機構を理解するためには、このような反応の初期過程を詳細に理解することが重要であることが示唆される。

## 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 2 件)

1. Mizukami T., Abe Y., Maki K. "Evidence for a Shared Mechanism in the Formation of Urea-Induced Kinetic and Equilibrium Intermediates of Horse Apomyoglobin from Ultrarapid Mixing Experiments." PLOS ONE, 査読有, 10, 2015, e134238.
2. Mizukami, T., Xu, M., Cheng, H., Roder, H., Maki K. "Nonuniform Chain Collapse during Early Stages of Staphylococcal Nuclease Folding Detected by Fluorescence Energy Transfer and Ultrarapid Mixing Methods." Protein Science, 査読有, 22, 1336 – 1348.

[学会発表] (計 18 件)

1. Mizukami, T., Xu, M., Cheng, H., Roder, H., Maki K. "FRET と高速溶液混合法による SNase の凝縮過程の速度論的研究" 第 52 回日本生物物理学会年会, 2014 年 9 月 25 – 27 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
2. Andou, T., Maki K. "変異体解析を用いた

- 緑色蛍光蛋白質の安定化機構におけるヒスチジン残基の役割に関する研究” 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
3. Abe, Y., Mizukami, T., Maki, K. “ウマアポミオグロビンの pH 4 中間体と塩による中間体の速度論的性質” 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
  4. Maki, K. “ストップ・フロー装置を用いた速度論的研究” 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25-27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(神奈川県・横浜市)
  5. 阿部有紀子, 水上琢也, 榎互介 “高速溶液混合法を用いたアポミオグロビンの中間体の研究” 日本物理学会第69回年次大会, 2014年3月27-30, 東海大学湘南キャンパス(神奈川県・相模原市)
  6. 安藤太一, 榎互介 “変異体解析を用いた緑色蛍光蛋白質の安定性におけるヒスチジン残基の役割” 日本物理学会第69回年次大会, 2014年3月27-30, 東海大学湘南キャンパス(神奈川県・相模原市)
  7. 寺内駿, 神庭圭佑, 森義治, 榮慶丈, 中村敬, 岡本祐幸, 桑島邦博, 榎互介 “核磁気共鳴法と分子動力学シミュレーションによるスタフィロコッカル・ヌクレアーゼの水素結合形成の研究” 日本物理学会第69回年次大会, 2014年3月27-30, 東海大学湘南キャンパス(神奈川県・相模原市)
  8. Abe, Y., Mizukami, T., Maki, K. “Folding of salt-induced intermediate of apomyoglobin using ultrarapid mixing methods.” 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28-30日, 京都国際会議場(京都府・京都市)
  9. Andou, T., Maki, K. “The role of histidine residues in folding mechanism of green fluorescent protein studied by mutagenesis approach.” 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28-30日, 京都国際会議場(京都府・京都市)
  10. Terauchi, S., Kamba, K., Mori, Y., Sakae, Y., Nakamura, T., Okamoto, Y., Kuwajima, K., Maki, K. “The Stability and Folding/Unfolding of Staphylococcal Nuclease at the Residue Level.” 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28-30日, 京都国際会議場(京都府・京都市)
  11. 寺内駿, 神庭圭佑, 森義治, 榮慶丈, 中村敬, 岡本祐幸, 桑島邦博, 榎互介 “核磁気共鳴法とレプリカ交換分子動力学シミュレーションによるスタフィロコッカル・ヌクレアーゼの安定性とフォールディング/アンフォールディングの研究” 第68回日本物理学会年次大会, 2013年3月26-29日, 広島大学(広島県・東広島市)
  12. 市川 達人, 森 義治, 榮 慶丈, 岡本 祐幸, 榎 互介 “変異体解析と計算機シミュレーションを用いたスタフィロコッカル・ヌクレアーゼの構造の研究” 2012年度生物物理学会中部支部講演会, 2013年2月19日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
  13. 寺内駿, 神庭圭佑, 森義治, 榮慶丈, 中村敬, 岡本祐幸, 桑島邦博, 榎互介 “スタフィロコッカル・ヌクレアーゼの残基ごとの安定性とフォールディング/アンフォールディングの研究” 2012年度生物物理学会中部支部講演会, 2013年2月19日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
  14. Maki, K. “Stability and Folding/unfolding of staphylococcal nuclease at residue level.” Indo-Japan Workshop in Recent Advances in Spectroscopy and Microscopy: Fundamentals and Applications to Materials and Biology, 2012年11月20-21日(Hyderabad, India)(招待講演)
  15. Mizukami T., Xu M., Roder H., Maki K. “Heterogeneous intramolecular chain collapse in the early stages of staphylococcal nuclease folding monitored by fluorescence resonance energy transfer and ultrarapid mixing” 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22-24日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)
  16. Mizukami T., Roder H., Maki K. “Intramolecular collapse during the folding of staphylococcal nuclease monitored by fluorescence resonance energy transfer” 26th Annual Symposium of the Protein Society, 2012年8月5-8日(San Diego, USA)
  17. 榎 互 介 “Folding mechanisms of apomyoglobin: a classical model protein of protein folding studies.” 第12回日本蛋白質科学会, 2012年6月20-22日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
  18. 水上琢也, Heinrich Roder, 榎互介 “蛍光共鳴エネルギー移動を用いたスタフィロコッカル・ヌクレアーゼのフォールディングに伴う分子内凝縮過程の研究” 第12回日本蛋白質科学会, 2012年6月20-22日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)(ポスター賞受賞)
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]  
○出願状況(計0件) ○取得状況(計0件)
- [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