タンパク質のフォールディング・エレメント

産業技術総合研究所生物機能工学研究部門 新井宗仁, 巖倉正寛

From the viewpoint of the sequence space, the protein folding problem can be regarded as a problem of searching for the determinants of protein foldability. The concept of “folding elements (FEs)” has emerged from the search for the amino acid sequence essential for a protein to be foldable. Here we review the characteristics of the FEs of a small globular protein, dihydrofolate reductase, and the necessary conditions for the protein to be foldable. We also review the relationship between the FEs and the kinetic folding reaction and propose the FE-assembly model of protein folding.

protein folding / folding element / foldability / dihydrofolate reductase / sequence space / systematic sequence perturbation analysis

1. はじめに

タンパク質のフォールディング問題は、ポストゲノムの現在、最も優先して解決されるべき課題の1つである。タンパク質のフォールディング問題に対する主要なアプローチの1つは、ある配列が作るコンホメーション空間の自由エネルギー地形を特徴づけ、変性状態から天然状態が形成されるフォールディング機構を明らかにするというものである。これまでにストップフロー法、水素交換パルスラベル法、連続フロー法などのさまざまな速度論的手法が開発され、タンパク質工学的手法などを組み合わせることによって、フォールディングの中間体や遷移状態が詳細に特徴づけられてきた¹⁾⁻³⁾。

一方、これとは独立なアプローチとして、配列空間という視点からタンパク質のフォールディング問題にとり組むことも可能である。100残基のアミノ酸からなるポリペプチドには 20^{100} 通りの配列が可能である。これらが作る配列空間の中には、天然に存在する球状タンパク質のようにフォールドできる (foldable な) 配列と、フォールドできない (non-foldable な) 配列が存在し、すべての配列はいずれかに分類可能である。ここで “foldable” な配列とは、生理的条件下において熱力学的に安定なフォールド状態をもち、かつ、実験室時間内で変性状態からフォールド状態へ到達可能な配列であると定義する⁴⁾。このとき、タンパク質のフォールディング問題とは、「タンパク質が foldable か non-foldable のいずれになるのかを決定する因子を解明する

問題」とみなすことができる。すなわち、どのようなアミノ酸配列やどのような相互作用がタンパク質を foldable にするのかを明らかにすることが課題となる。あるいは、タンパク質が foldable になるための必要十分条件を解明することが課題であるといった換えることもできる。こうした研究は、タンパク質のデザイン法開発と直結しているばかりでなく、タンパク質進化についての示唆も与える。

上記2つのアプローチはいずれも重要であるが、我々はこれまで、おもに後者の観点から研究を行ってきた。本稿では、こうした研究から得られた「タンパク質のフォールディング・エレメント」という概念について紹介する。

2. タンパク質のフォールディング・エレメント (FE)

タンパク質が foldable となる上で重要なアミノ酸や局所配列を探索するには、タンパク質の foldability に摂動を与えるような変異を、アミノ酸配列の全領域に網羅的・系統的に導入し、その応答を解析すればよい。このような摂動として、アミノ酸置換や円順列置換などがある。円順列置換変異 (circular permutation) とは、オリジナルの N, C 末端を適切なリンカーで連結し、他の部位を切断して新しい N, C 末端とする変異方法である。もし円順列置換によって主鎖を切断し新しい末端とすると non-foldable になる部位があるならば、そこは「foldable であるためには主鎖の連結が必須な部位」である。こうした変異を、あるタンパク質のアミノ酸

Folding Elements of Proteins

Munehito ARAI and Masahiro IWAKURA

Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Fig. 1 (Top) Positions of the folding elements (FEs) are shown in the schematic representation of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase (DHFR) (PDB code: 1rx1)⁹⁾. (Bottom) Ten FEs with the 3-15 residue length are distributed over the amino acid sequence. Regions forming a weak hydrogen bond within 13 ms of refolding¹³⁾ are shown by *.

配列の全領域に網羅的に導入することにより, foldable となる上で重要なアミノ酸や局所配列を同定できる。

大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) は 159 残基の単量体タンパク質であり, 2つのサブドメインからなる (Fig. 1)⁵⁾。この酵素は, NADPH を補酵素としてジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する反応の触媒として働き, 原核から真核生物までの葉酸の代謝において必須である⁶⁾。

我々のグループでは, DHFR をモデルタンパク質として用い, 158 個の網羅的な円順列置換変異体を作製し, すべての残基間について, 主鎖を切断した際にタンパク質が non-foldable になるかどうかを調べた。その結果, 主鎖を切断することによって non-foldable になる部位は, アミノ酸配列上 10 箇所 (それぞれ 3-15 残基の連続した配列) に分かれて存在していた (Fig. 1)。これら 10 個の配列は, タンパク質が foldable になるために必須

の領域であることから, フォールディング・エレメント (folding element, FE と略す, 構造形成要素ともいう) と名づけた^{7), 8)}。

3. 言語とのアナロジー

フォールディング・エレメントは切断してはいけない局所配列であるから, タンパク質の基本単位として合理的なものであり, これにもとづいてタンパク質構造を階層的に考えることが可能だろう。タンパク質は一方性の 1 次元鎖であり, N 末端から C 末端までの全体で 1 つの立体構造をコードする。この性質は言語と類似しており, アミノ酸配列を「文」とするアナロジーが可能である。また, 「単語」は連続した文字によって構成されるから, FE を「単語」とするアナロジーが可能である。タンパク質のフォールディング問題は, 適切な「単語」と「文法 (= FE の連結規則)」を見つけ出すことによって解明されるかもしれない。

円順列置換変異はタンパク質の foldability に対する摂動が大きく, 変異体は foldable/non-foldable に二分されたが, アミノ酸置換変異の中には foldability への摂動が弱いものもあり, さまざまなアミノ酸置換を FE 内に導入しても, 変異体は foldable になりうる。すなわち, フォールディング・エレメントの配列は robust であり, 「同義語」が多数存在する。FE の同義語を網羅的に探索し, 同義語の辞書を作る (あるいは profile を作る) ことによって, 他のタンパク質の FE 領域を予測できるかもしれない。ただし, FE の同義語を探索するためには, FE 領域のみを切り出したペプチドに変異を加えて研究するのみでは不十分であり, 全長タンパク質に変異を導入して調べなければならない⁹⁾。このことは, フォールディング・エレメントが非局所的相互作用において重要な役割を果たすことを示唆している。

4. フォールディング・エレメントの構造特性

FE がどのような構造特性をもつのか明らかにするために, DHFR のさまざまな構造特性と FE との対応関係を調べた。その結果, 機能に関する領域とは対応していなかったが, FE の多くはヘリックスやシートという 2 次構造要素を含んでいた^{7), 8)}。しかし 2 次構造要素と FE の切れ目は一致しておらず, また, すべての 2 次構造要素が FE (すなわち foldability) と関係しているわけではない。したがって, フォールディング・エレメントは 2 次構造要素とは別の配列単位である。

FE は 10 残基前後の配列であるから, 単独で 1 つの構造単位として機能し, 安定な構造を形成する可能性がある。これを調べるために, FE 部分に対応するペプチドを合成し, それらの構造を円二色性スペクトルにより

Fig. 2 Circular dichroism spectra of the FE1 peptide (residues 2-14) of DHFR. The peptide is unfolded under the native conditions, while it forms non-native helices in the presence of trifluoroethanol (TFE). Circles show the spectrum of the unfolded state.

測定した (Fig. 2)。その結果、天然条件下では、FE単体は安定な2次構造を形成できないことがわかった。また、トリフルオロエタノール存在下では非天然のヘリックスを形成するFEもあった (Fig. 2)。これらの結果は、フォールディング・エレメントは単独で天然状態様の構造を安定に形成できるユニット (autonomous folding unit, AFU) ではないことを示している¹⁰⁾。FE領域が構造形成するためには、FE同士の相互作用や、FE以外との相互作用が必要である。

5. タンパク質がfoldableであるための必要条件

円順列置換変異によってFEを壊すとタンパク質はfoldableでなくなることから、タンパク質がfoldableであるための必要条件の1つは、すべてのFEが存在していることであるといえる^{7), 8)}。一方、新しいN末端をFE以外に導入した円順列置換変異体はfoldableであることから、FEの連結順序を変換しても、タンパク質はfoldableになりうるといえる。実際、円順列置換変異体以外にも、[FE7, FE8, FE9, FE10]の順番を[FE9, FE10, FE7, FE8]に変換したトポロジカル変異体もfoldableであった¹¹⁾。

では、FEが存在しているだけで十分なのだろうか？

FE部分に対応するペプチドを混合してみたが、FEペプチド間の相互作用は非常に弱く、天然状態様の2次構造は形成されなかった¹⁰⁾。したがって、FEだけが存在していればよいのではなく、FEが適切に連結されていることも、タンパク質がfoldableであるための必要条件である。ただし、どのようなFEの連結方法ならばfoldableになるのかは、今後解明すべき課題である。

6. タンパク質フォールディングにおけるFEアセンブリ・モデル

DHFRは、フォールディング反応初期(数ミリ秒以内)に中間体を形成したあと、5つのフェーズを経て天然状態へとフォールドすることが知られている¹²⁾。この中間体では2次構造が部分的に形成されており、水素結

Fig. 3 A folding scheme of foldable sequences based on the FE-assembly model of protein folding⁴⁾. (a) Foldable polypeptides with the intact FEs, such as the wild type, circular permutants, topological mutants, and point mutants with amino acid substitutions outside of the FEs, form similar intermediates early in the folding via the interactions between the FEs. (b) Foldable polypeptides with the FEs perturbed, such as the point mutants with amino acid substitutions inside of the FEs, form the intermediates with different structures from that of the wild type.

Fig. 4 Systematic sequence perturbation analysis for the burst-phase intermediate of DHFR¹⁶⁾. Systematic single amino acid substitutions were introduced inside of the FEs (W30X in FE2, V40X in FE3, N59X in FE4, and I155X in FE10; X refers to various amino acids), and their kinetic refolding reactions were measured by stopped-flow circular dichroism. The mutations outside of the FEs (S148X) were used as a control. Short horizontal bars show the differences in mean residue ellipticity (ΔMRE), of the burst-phase intermediate between the wild type and the mutants indicated by alphabets. For each mutation site, the average and the standard deviation of the ΔMRE values are shown by a diamond and a thick vertical line, respectively. The average values of W30X, N59X, and I155X are significantly different from that of a control (S148X) according to Student's *t*-tests, indicating that these mutations affect the interactions around the mutation sites in the intermediate.

合が弱く形成されている部位があるが¹³⁾, これらの部位はほぼすべて, FE内に含まれていた (Fig. 1)^{7), 8)}. このことから, FEはフォールディング反応の初期事象となんらかの関係をもつと考えられる. そこで, さまざまな変異体のフォールディング反応をストップフロー円二色性法で測定し, 中間体の構造を特徴づけた結果, 次のことが明らかになった⁴⁾. (1) FEの連結順序を変えた変異体(円順列置換変異体とトポロジカル変異体)では, 中間体の構造が類似していた. このことは, FEがすべて存在しているならば, フォールディング反応初期に形成される構造が保存されることを示す (Fig. 3a). (2) FE内に一アミノ酸置換変異を導入してFEに摂動を加えると, 中間体の構造が大きく変化した, FE外への変異では構造変化は小さかった. このこ

とは, FE同士がフォールディング反応初期に相互作用していることを示す (Fig. 3b).

これらの実験結果を説明するモデルとして, 「フォールディング反応初期にFE同士が相互作用して集合し, 特異的な構造をもった中間体を形成する」というFEアセンブリ・モデルが考えられる⁴⁾. そして, FE同士が相互作用するという事象こそが, タンパク質がfoldableになる上で重要であると考えられる.

7. フォールディング反応初期におけるFE間相互作用

それでは, どのFEがフォールディング反応初期に相互作用するのだろうか? これを明らかにするために, 我々はDHFRのフォールディング中間体の構造を詳細に特徴づける研究を開始した. 通常, Φ 値解析²⁾などを用いて中間体や遷移状態の構造を調べる場合には, AlaやGlyに置換した変異体のみを用いるが, 少数の変異体だけで得られた結果は, 置換したアミノ酸の影響を見ているのか, それとも, 変異部位自体の特性を見ているのか不明である^{14), 15)}. そこで我々は, 1つの変異部位に19種類の網羅的な一アミノ酸置換変異を導入し, foldableになった変異体についてフォールディング反応の測定を行い, その結果を統計的に解析するという方法(網羅的配列摂動解析法)を開発した (Fig. 4)¹⁶⁾. この方法を用いて中間体の構造解析を行った結果, おもにループ・サブドメイン (Fig. 1)に存在するFE (FE1, FE2, FE6, FE7, FE10)がフォールディング初期に相互作用し, 疎水性クラスタを形成することが示唆された^{16), 17)}. これらのFEはおもにN, C末端付近およびサブドメイン境界付近に存在する. こうしたFEが疎水性相互作用などによって集合し安定化されることによって, 天然構造様の主鎖トポロジーが反応初期に形成されるのだろう. そして, FEの中でも特にこれらのFEが, DHFRのfoldabilityと強く関係していると考えられる.

8. おわりに

配列空間という視点からタンパク質のフォールディング問題を捉え直すことにより, フォールディング・エレメントという概念が登場し, フォールディング問題解明に向けての新たな展望が開けてきたと思われる. これまでの結果をまとめると, フォールディング・エレメントとは単独で安定構造を形成できるユニットではなく, 非局所的相互作用において重要な役割を果たす領域であり, こうした相互作用を通してfoldabilityに関与していると考えられる. そして, FE間相互作用を妨げるような操作を加えると, タンパク質はnon-foldableになると考えられる. したがって, FE間相互作用を効

率的に実現させることが、タンパク質をfoldableにするための必要十分条件であると推測される。

しかし、これはまだ推測にすぎないし、具体的な条件は明らかでない。foldabilityの決定因子解明のためには、FE間相互作用の解析、FEの同義語の網羅的探索、FEの連結規則の調査、他のタンパク質への応用、FE概念の一般化など、今後なすべき課題が山積みである。しかし、こうした地道な研究こそがブレークスルーになると信じて、タンパク質のフォールディング問題という数十年来の難問に挑み続けていきたい。

謝 辞

本研究の共同研究者である槇互介博士（東大）、高橋尚氏（産総研）、およびグループ員の山子知織さん、藤沢愛子さん、大瀬明子さん、竹縄辰行氏、皿良剛氏に感謝いたします。この研究の一部は、文部科学省からの助成により行われたものです。

文 献

- 1) Arai, M. and Kuwajima, K. (2000) *Adv. Protein Chem.* **53**, 209-282.
- 2) Fersht, A. R. (1999) *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*, W. H. Freeman and Company, New York.
- 3) Pain, R. H. (2000) *Mechanisms of Protein Folding*, 2nd ed., Oxford University Press, New York.
- 4) Arai, M., Maki, K., Takahashi, H. and Iwakura, M. (2003a) *J. Mol. Biol.* **328**, 273-288.
- 5) Sawaya, M. R. and Kraut, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 586-603.
- 6) Schnell, J. R., Dyson, H. J. and Wright, P. E. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 119-140.
- 7) Iwakura, M., Nakamura, T., Yamane, C. and Maki, K. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 580-585.
- 8) 巖倉正寛 (2001) 生物物理 **41**, 278-283.
- 9) Arai, M., Takahashi, H. and Iwakura, M. (2005) manuscript in preparation.
- 10) Arai, M. and Iwakura, M. (2005a) submitted.
- 11) Iwakura, M., Takenawa, T. and Nakamura, T. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 769-777.
- 12) Jennings, P. A., Finn, B. E., Jones, B. E. and Matthews, C. R. (1993) *Biochemistry* **32**, 3783-3789.
- 13) Jones, B. E. and Matthews, C. R. (1995) *Protein Sci.* **4**, 167-177.
- 14) Garvey, E. P. and Matthews, C. R. (1989) *Biochemistry* **28**, 2083-2093.
- 15) Northey, J. G., Maxwell, K. L. and Davidson, A. R. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 389-402.
- 16) Arai, M. and Iwakura, M. (2005b) *J. Mol. Biol.* **347**, 337-353.
- 17) Arai, M., Kataoka, M., Kuwajima, K., Matthews, C. R. and Iwakura, M. (2003b) *J. Mol. Biol.* **329**, 779-791.

新井宗仁

新井宗仁（あらい むねひと）

産業技術総合研究所生物機能工学研究部門蛋白質デザイン研究グループ研究員

1998 年東京大学大学院理学系研究科博士課程中途退学，同年より東京大学大学院理学系研究科物理学専攻
桑島研究室助手，博士（理学），2002 年より現職。

研究内容：タンパク質のフォールディング機構に関する研究

趣 味：マンドリン，ギター，モーツァルト

連絡先：〒306-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

E-mail: munehito-arai@aist.go.jp

巖倉正寛（いわくら まさひろ）

産業技術総合研究所生物機能工学研究部門部門長，（兼）蛋白質デザイン研究グループグループリーダー

1979 年京都大学大学院理学研究科博士課程修了後，通商産業省・工業技術院繊維高分子材料研究所に入所，
以後，工業技術院，通商産業省の再編に伴い，産業技術融合領域研究所，生命工学工業技術研究所を経て，
現在に至る。この間，89 年から 91 年に米国ペンシルバニア州立大学（C. R. Matthews 教授）において在外研
究，理学博士。

研究内容：配列空間探索によるタンパク質デザイン

連絡先：〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

E-mail: masa-iwakura@aist.go.jp