解説

1分子測定によるタンパク質の折りたたみ研究の展開

鎌形清人^{1,2,3}, 木下雅仁^{2,3}, 高橋 聡^{1,2,3}¹東北大学多元物質科学研究所²大阪大学蛋白質研究所³CREST / JST

To understand the molecular mechanism of protein folding, it is necessary to reveal the dynamics of single proteins from the unfolded state to the folding transition state. We therefore developed a new system that can detect fluorescence signals from free single proteins for extended time periods. The system enabled us to characterize a slow conformational dynamics for the unfolded state of cytochrome *c*. Furthermore, we proposed a method to estimate the equilibration time for the intermediate state of protein folding.

protein folding / single molecule observation / conformational dynamics / equilibration time

1.

Baldwin の回想から

1968 年のある日、スタンフォード大学において Levinthal によるセミナーが開かれ、後に Levinthal のパラドックスとして知られる議論が紹介された。すなわち、変性したタンパク質はランダムコイル鎖の性質をもっている。したがって、変性タンパク質がもつ構造数は莫大である。この中からランダムに構造検索を行うならば、タンパク質の折りたたみには宇宙の年齢よりも長い時間が必要になる…。このセミナーには、折りたたみ研究をまだ開始していない 41 歳の Baldwin と、ノーベル化学賞を受賞する直前の Flory も出席していた。Baldwin の回想によると：

Paul Flory was sitting next to me at the seminar and he leaned over to whisper, “So there must be folding intermediates.”

Flory のこの一言は、Baldwin がタンパク質の折りたたみ研究を開始するきっかけとなった¹⁾。

このセミナーから 40 年が経過している。この間に「タンパク質はなぜ構造を作ることができるのか」という問題の理解には、大きな進展が見られた。特に、

後述する「整合性原理がタンパク質に働く」とする郷理論の提案と、この理論が実験的に検証されたことは、科学史に残る成果だと思われる。しかし、タンパク質の折りたたみ問題がこれで解決したわけではない。現在でも、タンパク質の構造予測はおろか、あるアミノ酸配列が折りたたまれるかどうかを判断することでさえもたいへん難しいのである。この問題の解決をめざすには、新しい研究戦略を導入する必要があると思われる。

本解説では、タンパク質の折りたたみ研究の現状についてのわれわれの問題意識と、1 分子観察法を使った最近の努力を紹介したい。本解説から、タンパク質の折りたたみ研究は、今後も新しい手法や概念を生み出す重要な課題であることを理解していただけたらと願っている。

2.

分野の現状とわれわれの問題意識

2.1 郷理論の確立と応用

タンパク質のもっとも顕著な特性の 1 つは、折りたたみ転移の協同性である。すなわち、変性状態から折りたたまれた状態へのタンパク質の構造転移は一気に起こり、部分的に変性した中間体は、存在しないか、

New Insights into the Mechanism of Protein Folding by Single Molecule Detection

Kiyoto KAMAGATA^{1,2,3}, Masahito KINOSHITA^{2,3} and Satoshi TAKAHASHI^{1,2,3}¹Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University²Institute for Protein Research, Osaka University³CREST, JST

せいぜい数個しか観察されない。同様に、折りたたまれた状態から変性状態に移る構造変化も協同的に進む。ポリペプチド鎖の構造の自由度に比べ、タンパク質の状態数が極端に少ないことは驚くべき特徴である。

折りたたみ転移の協同性について、最初に理論的な考察を行ったのは郷である²⁾。郷は、ビーズがつながった仮想的な鎖についての計算結果を検討し、タンパク質の分子内相互作用には整合性原理 (consistency principle) が成立すると主張した³⁾。すなわち、タンパク質の折りたたみ過程では、はじめにアミノ酸配列上で近い残基間に働く相互作用 (近距離相互作用) により部分構造が作られる。この構造は不安定だが、アミノ酸配列上で遠い残基間の相互作用 (遠距離相互作用) により安定化され、折りたたみ構造の一部となる。したがって、タンパク質には近距離の相互作用で作られる部分構造同士が安定化するように、遠距離の相互作用を作る特性がある。郷は、この特性を「近距離の相互作用と遠距離の相互作用が天然の (折りたたまれた) 構造と整合性をもつ」と表現した。

郷の提案を、最も簡単な形で具体的に表現するのは郷ポテンシャルである。郷ポテンシャルでは、ビーズ鎖を基礎として、折りたたんだときに接触するビーズの間にのみ引力を仮定する。このポテンシャルが働くビーズ鎖は、整合性原理が主張するように、接触しやすい近距離の相互作用を最初に形成し、次に遠距離の相互作用を形成して構造を作る。郷ポテンシャルは、構造の選択性が非常に高い特性をもっている。すなわち、郷ポテンシャルが働くビーズ鎖は、余計な構造探索を行わずに、間違った構造を回避して短時間内に構造を作る。郷ポテンシャルが Levinthal のパラドックスを解決することは、自明であるともいえる。

郷の提案が、現実のタンパク質で本当に成立しているかどうかを調べることは困難だった。しかし、90年代にタンパク質の折りたたみ遷移状態の構造を調べる ϕ 値解析法が開発されたことで、状況が一変した⁴⁾。約 20 種類のタンパク質について ϕ 値解析がなされたが、結果の多くが郷ポテンシャルを仮定したモデル計算と定性的に一致したのである⁵⁾。現在では、郷ポテンシャルの成立はタンパク質の基本的な性質であると捉えられている。Wolynes らにより提案されたエネルギー地形理論も、本質的な部分は郷理論と等価だとされる^{6),7)}。

最近、タンパク質の折りたたみの応用として、特定の構造に折りたたむアミノ酸配列を予測すること、または、配列から構造を予測することが活発に試みられ

ている。通常の研究者は、郷理論をもとにタンパク質の構造予測を行うことは無理だと考えたろう。しかし、Baker は整合性原理の意義を正しく捉えることで、フラグメントアセンブリー法とよばれる構造予測法を開発した⁸⁾。この方法は、構造が未知のタンパク質の構造を、構造が既知のタンパク質から切り出したフラグメントの構造を組み合わせることで予測する。この手法には、「あるフラグメントの構造 (近距離の相互作用による部分構造) が、あるタンパク質の遠距離相互作用により安定化されるなら、同じ配列による部分構造は他のタンパク質の遠距離相互作用でも安定化される可能性が高い」とする仮定が含まれる。フラグメントアセンブリー法は、構造予測において大きな成功をおさめているだけでなく、新規のタンパク質や酵素のデザインにも応用され、タンパク質科学にブレイクスルーをもたらしている⁹⁾。

2.2 われわれの問題意識: 折りたたみ遷移状態にいたるまでの運動をどうしても知りたい

郷の理論は大きな成功を収めているが、タンパク質が折りたたまれる性質の肝心な部分を説明しないことを強調したい。郷ポテンシャルは、変性したタンパク質に文字通りに働くわけではない。実際のタンパク質では、静電相互作用やファンデルワールス相互作用など、さまざまな微視的相互作用がアミノ酸の 1 次配列に依存して働く。郷理論は、これらが重ね合わさりタンパク質が運動を行った結果として、整合性原理が満たされることを主張している。しかし、なぜタンパク質の 1 次配列では整合性原理が成立し、折りたたまらないポリペプチド鎖の配列では成立しないのか、という問いには答えていない。この問いは、タンパク質の折りたたみ問題の中の肝心な部分である。この問いに答えられないために、Baker らの成果はあるものの、タンパク質の構造予測や設計は、いまだにたいへん困難な課題として残されているともいえる。

われわれは、タンパク質の変性状態についての十分な知見が蓄積されていないために、郷理論を超えた理解が進まないという問題意識をもっている。郷理論の成立は、折りたたみ遷移状態でのみ確認されている。一方で、折りたたみ過程の出発点である変性状態の構造や、変性状態から折りたたみの遷移状態に到るまでの運動などの特性は確立されていない。これらを観測し、折りたたんだ構造と平衡関係にある変性状態を理解しなければ、折りたたみ問題も理解できないとわれわれは考えている。

タンパク質の変性状態における構造特性と運動性に

ついて、多くの異なる主張がなされている。たとえば、Levinthal のパラドックスの基礎である「変性タンパク質はランダムコイルである」という仮説について、仮説を支持する X 線小角散乱法によるデータが報告された一方で¹⁰⁾、変性タンパク質にも構造が残存するという分光データも蓄積されている¹¹⁾。また、後述するように、変性状態のタンパク質が微視的構造の間をどの程度の速さで遷移するのかという点についてもコンセンサスは得られていない。

変性状態にあるタンパク質の特性が確立していない主要因は、通常のパルクの観測手段を使う限り、変性タンパク質を構成する多数の微視的構造についての平均的な情報しか得られないことである。微視的構造の違いを区別し、変性状態のタンパク質の構造や運動性を直接調べるには 1 分子レベルでの観察が望ましい。特に、1 分子を継続的に観察することで、変性したタンパク質が折りたたみ遷移状態にいたるまでの運動をどうしても知りたい (図 1)。以上のモチベーションをもち、われわれは、タンパク質の変性状態を捉えるための 1 分子観察法を開発する研究を約 5 年前に開始した。

3. われわれの研究努力

3.1 新しい 1 分子測定法の開発

タンパク質の構造探索運動を 1 分子レベルで追跡する手法として、タンパク質の両末端に 2 つの色素をラベルし、色素間のエネルギー移動を蛍光強度比から観測する方法が使われる。この観測のために、おもに 2 つの方法が提案されている。1 つは光学基板にタン

図 1
タンパク質の折りたたみ。U, I, TS, N は、それぞれ、変性状態、中間体、遷移状態、天然状態を表す。タンパク質は膨大な数の微視的構造からなる変性状態を効率よく探索し、遷移状態を経て、天然状態へと折りたたまれる。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/> ではカラーで掲載)

パク質を固定する方法である¹²⁾。この方法は、1 分子を長時間 (数 10 秒) 連続観測することが可能であるが、分子と基板との相互作用によるアーティファクトが生じやすい。もう 1 つは、共焦点顕微鏡を使う方法である。この手法は、タンパク質を固定しないために基板との相互作用がない利点がある¹³⁾。しかし、タンパク質が観測領域に留まる時間が短く、観測時間は最大 1 ミリ秒程度しかない。このように、従来の 1 分子レベルでの蛍光観察法にはそれぞれ欠点があった。2 つの手法の欠点を補いたいとの希望は強く、空間的にタンパク質をトラップするために、脂質ベシクルを用いる手法なども提案されているが、吸着の問題が存在する¹⁴⁾。

では、どのようにシステムを組めば、分子を基板に固定せずに長時間の測定ができるだろうか？ われわれの答えは「細いキャピラリーにタンパク質を流し、低倍率の集光レンズを通してタンパク質から出る蛍光を観測する」ことである (図 2)¹⁵⁾。この手法では、タンパク質が一定の速度で動くために、集光された蛍光は CCD 上に輝線としてイメージングされる。したがって、輝線の位置を時間へ変換することにより、蛍光強度の時間変動を測定できる。現在の典型的な条件では、約 1 ミリ秒の時間分解能で測定ができる。また、低倍率のレンズにより観測領域を広げることで、最長で数秒の観測が可能である。このように、われわれが開発した方法は従来の 2 つの方法の架け橋をなすものである。

図 2
新規 1 分子観測装置。タンパク質はシリンジポンプによりキャピラリーへと供給される。観測領域に流れてきたタンパク質 1 分子 (赤い点) は、キャピラリーと垂直に入射されたレーザー光により励起され、蛍光を発する。蛍光は、スリット型の空間フィルターと適当な光学フィルターを透過し、イメージインテンシファイア (I.I.) で増幅され、CCD 上にイメージングされる。I.I. と CCD の代わりに、EM-CCD を使用する場合もある。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/> ではカラーで掲載)

3.2 1 分子測定の例:変性状態の遅い運動¹⁵⁾

開発した装置の最初の応用として、酵母のシトクロム *c* を使用した。この試料は、C 末端にシステイン残基をもつため、蛍光色素 Alexa532 を容易にラベルできる。また、N 末付近にヘムをもつため、ラベルした色素とヘムとの距離に応じて蛍光を消光する。そのため、Alexa532 の蛍光強度を測定することにより、試料構造の時間発展を観測できる。

酵母のシトクロム *c* についての 1 分子データをもとに、自己相関関数を用いて変性状態の運動性を調べた。この関数の減衰は蛍光強度の保持時間を表す。つまり、タンパク質の構造変化に伴い色素とヘム間の距離が変化すると、過去の蛍光強度との相関がなくなり、自己相関関数は 0 に収束する。計算された自己相関関数から、シトクロム *c* の変性状態の場合は約 15 ミリ秒、中間体の場合はミリ秒以下の減衰が観測された。色素単体のデータではより遅い減衰が観測されたため、変性状態の自己相関はタンパク質の運動を表すと考えられる。したがって、変性状態にはミリ秒よりも長い時間スケールの遅い運動があることが示唆された。

Schuler らは、共焦点顕微鏡を用いた 1 分子測定を行い、cold shock protein の変性状態内の運動がサブマイクロ秒のオーダーであることを報告した¹⁶⁾。また、蛍光相関解析の測定から、さまざまなタンパク質の変性状態にサブミリ秒の運動が観測された¹⁷⁾。一方、われわれの結果はミリ秒の運動が存在するというものである。このように、タンパク質の変性状態の運動の時間スケールとしてさまざまな値が報告されている。

変性状態がさまざまな時間スケールの運動性を示すのはなぜだろう？ ランダムコイル鎖の運動として思いつくのが、主鎖の大規模なゆらぎに伴って 2 点間の距離が変動する運動である。この運動はサブマイクロ秒からマイクロ秒のオーダーであると予想されるが、観測された運動はもっと遅い。このことから、われわれが観測した運動は、主鎖の単純なゆらぎ運動ではなく、特定の構造形成とその崩壊に伴う遅い運動である可能性が高い。ただし、シトクロム *c* 特有の運動として、ヘムへの間違ったアミノ酸の配位などの可能性も否定できない。われわれは、ヘムへの間違った配位をしないシトクロム *c* やヘムをもたない 1 本鎖モネリンなどの試料を用いて、遅い運動性の有無やその原因を突き止めようと考えている¹⁸⁾。

われわれの観測した遅い運動が特定の構造形成とその崩壊に伴うものであるとすれば、変性状態はランダムコイルではないことが示唆される。一方で、多くの

タンパク質がランダムコイル並みに速い運動性をもつことも確かである^{16), 17)}。これらの結果は、タンパク質ごとにランダムコイルであったり、残余構造があったりすることを示すのかもしれない。あるいは、変性したタンパク質は、あるときはランダムコイルとして振る舞い、あるときは特定の構造を形成する運動を示すのかもしれない。今後のデータの積み重ねから、多くの知見が得られると期待される。

3.3 平衡化時間の推定

1 分子の時系列データから構造探索空間上の構造探索運動を特徴付けることができる。その 1 つが平衡化時間の推定である。平衡化時間とは、ある 1 分子が許された構造空間を経巡り、平衡に達するために必要な時間に対応する。これは、ミクロとマクロを結ぶ重要な物理量だが、タンパク質の構造空間に関して推定された例は数少ない。

われわれは 1 分子の時系列データから平衡化時間を推定する新しい手法を開発している¹⁹⁾。この手法では、多くの分子について得られた蛍光強度分布を平衡化された強度分布として、1 分子の時系列データが平衡化された強度分布を再現するために必要な時間から、平衡化時間を推定する。このために、ある時間域の時系列データから強度分布を取り出し、分布間検定を用いて平衡化された分布と同じか違うかを判定する(図 3)。

開発した手法を用いて、酵母のシトクロム *c* の中間体の平衡化時間を推定した。中間体は、図 1 の変性状態と天然状態の間に位置する状態で、ほどけた状態に比べてより構造形成が進んだ状態である。中間体は天然構造のような単一の構造をもつのではなく、多数の構造の集合体であると考えられている。これらの構造の探索に関する平衡化時間を推定するために、開発した手法を中間体の 1 分子データに適用したところ、測定の時間分解能 (5 ミリ秒) 以内に 2 つの分布が区別できなくなった。この値は、データの S/N に依存することや、2 点間の距離以外の構造の自由度の平衡化を考慮に入れていないことなどの理由により、平衡化時間の下限値を表している。したがって、シトクロム *c* の中間体における平衡化時間の下限値は、5 ミリ秒以内と推定された。今後、S/N のよいデータが取得できれば、より精度よく平衡化時間の推定ができると期待される。

われわれは、平衡化時間を目安に、タンパク質の変性状態や中間状態の構造空間の大きさを見積もりたいと考えている。特に、変性したタンパク質における平

図 3

平衡化時間の推定方法. 1 分子の時系列データ (左) が平衡化された強度分布 (右) を再現するために必要な時間を平衡化時間と定義する. 1 分子データから強度分布の時間発展 (中央) を計算し, 平衡化された分布との一致を統計的に判定する. (本図は, 冊子体ではモノクロ, 電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/> ではカラーで掲載)

平衡化時間は, はじめに紹介した Levinthal のパラドックスに直接かかわる物理量である. 現実のタンパク質における平衡化時間を見積もることで, タンパク質の折りたたみ問題を捉え直すことが可能になると期待される.

4.

まとめ

タンパク質の折りたたみ研究に新しい展開をもたらすことをめざして, われわれは変性状態の構造特性や運動性を実測することを目指し, タンパク質 1 分子を捉えるための実験手法を提案した. シトクロム *c* について得られたデータは, 変性状態における比較的ゆっくりとした運動の存在を示唆した. さらに, 1 分子のデータから平衡化時間を推定する手法を提案した.

今後, われわれは多くのタンパク質について 1 分子観察を行い, 変性状態における運動性の一般性と多様性を明らかにしたいと考えている. このために, 情報理論を基礎とした 1 分子時系列データの解析法の応用も楽しみである²⁰⁾. さらに, はじめに変性状態にあるタンパク質が, 変性状態でゆらぎ運動を起こしながら, 折りたたみ遷移状態を通過する全過程を追跡したいと考えている. このような努力を通して, タンパク質の構造予測にもつながる新たな知見を得ることをめざしている.

謝 辞

数多くの助言をいただきました後藤祐児教授 (大阪大学) に感謝します.

文 献

- 1) Baldwin, R. L. (2008) *Ann. Rev. Biophys.* **37**, 1-21.
- 2) Go, N. (1984) *Adv. Biophys.* **18**, 149-164.

- 3) 郷 信広 (1977) 日本物理学会春の分科会講演予稿集 271, 19770320.
- 4) Fersht, A. R., Matouschek, A. and Serrano, L. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 771-782.
- 5) Muñoz, V. and Eaton, W. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11311-11316.
- 6) Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D. and Wolynes, P. G. (1995) *Proteins* **21**, 167-195.
- 7) Takada, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11698-11700.
- 8) Simons, K. T., Kooperberg, C., Huang, E. and Baker, D. (1997) *J. Mol. Biol.* **268**, 209-225.
- 9) Jiang, L. *et al.* (2008) *Science* **319**, 1387-1391.
- 10) Kohn, J. E. *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12491-12496.
- 11) Shi, Z. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9190-9195.
- 12) Talaga, D. S. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13021-13026.
- 13) Schuler, B., Lipman, E. A. and Eaton, W. A. (2002) *Nature* **419**, 743-747.
- 14) Rhoades, E., Gussakovsky, E. and Haran, G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3197-3202.
- 15) Kinoshita, M. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10453-10458.
- 16) Nettels, D., Gopich, I. V., Hoffmann, A. and Schuler, B. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2655-2660.
- 17) Chen, H. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10459-10464.
- 18) Sambongi, Y. *et al.* (2002) *Eur. J. Biochem.* **269**, 3355-3361.
- 19) Kamagata, K. *et al.* in prep.
- 20) Baba, A. and Komatsuzaki, T. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 19297-19302.

鎌形清人

鎌形清人 (かまがた きよと)

東北大学多元物質科学研究所・助教

2005 年東京大学大学院理学系研究科修了・博士 (理学), 05-06 年日本学術振興会特別研究員 (東京大学), 06 年より大阪大学蛋白質研究所博士研究員. 09 年より現職.

研究内容: タンパク質の折りたたみ

趣味: フットサル

連絡先: kamagata@tagen.tohoku.ac.jp