若手研究者から「生物物理の未来に寄せて」

新技術によるタンパク質研究の新展開

鎌形清人

東北大学多元物質科学研究所

1. はじめに

タンパク質は巧妙に設計されており、実に興味深い。原理的に、アミノ酸の鎖の配列を変えれば、活性部位や全体構造が変わり、さまざまな機能が生みだされる。構造に関して、特定の構造だけが安定になるように設計されている。また、タンパク質の構造は変性構造も含めると、天文学的な数存在するが、天然のタンパク質は、生理的な時間で自発的に折りたたむことができる。いい換えれば、形状記憶をもつ紐とっていいだろう。さらに、タンパク質は多様な機能をもつ。化学反応の触媒には、化学反応の場を提供するように、カギとなるアミノ酸が巧妙に配置される。分子の結合解離には分子ゆらぎがうまく利用される。このような多様な機能を発揮する高分子は他にない。さらに、タンパク質研究の応用は生物学、医学、工学など非常に幅広く、タンパク質の奥深さを感じさせる。

2. タンパク質のダイナミクスの1分子計測

タンパク質を理解するためには、実験的にタンパク質の性質を明らかにする必要がある。私は、学生時代に、桑島邦博教授（現・岡崎統合バイオ）のもと、ストップフロー装置を駆使して、モデルタンパク質の折りたたみ過程の観測を行った¹⁾。さらに、数十のモデルタンパク質の折りたたみ速度と天然構造の統計解析から、高い相関関係を発見した²⁾。これらの研究は、折りたたみ過程の特徴づけには必須の実験や解析であった。しかしながら、従来のアンサンブル測定法やそこから得られる情報を基にタンパク質を理解することには限界がある。特に、折りたたみの開始点である変性状態や中間状態は多数の構造の平均として検出され、状態内に存在する構造分布や構造間のダイナミクスなどは平均化され観測できない。

そこで、タンパク質の構造転移を1分子レベルで観測することで従来のアンサンブル実験で隠されたゆらぎ運動を測定可能であると考え、高橋聡教授（東北

大）のもと、新規の蛍光1分子装置の開発を行った^{3), 4)}。この装置開発により、タンパク質を基板に固定することなく（基板にタンパク質を固定することによる、従来法のアーティファクトを回避し）、タンパク質1分子の構造転移の長時間観測が可能になった。さらに、小松崎ら（北大）の解析方法を用いることで、実験的にエネルギー地形を作製することが可能になった。1分子装置と解析技術の革新により、従来のアンサンブル法では困難であった多数の状態間のつながりを直接決定することが可能になった。

3. 実験・計算技術革新からの新展開

近年、実験技術と計算技術の開発に伴い、タンパク質の物性研究は新しい展開を迎えた。

まず、私たちの手法も含めて、実験技術に関して多くの進展があった。その1つは、安藤ら（金沢大）の開発した高速AFMの開発である⁵⁾。約30ミリ秒の分解能でタンパク質の構造変化を連続画像として検出することを可能にした。現在では多くのタンパク質に応用され、まさに機能しているタンパク質の動きを直接計測することで多くの知見を得ることに成功している。その他にも、X線1分子追跡法が開発され、1分子レベルでタンパク質内部のわずかな配向の変化を観測できるようになった⁶⁾。しかし、私たちの手法も含めて、より精度の高いタンパク質構造情報の取得や時間分解能の向上が今後の課題である。

過渡的なタンパク質の構造ゆらぎを検出できる手法も開発され、タンパク質の基質への結合機構が解明されつつある⁷⁾。さらに、細胞内のタンパク質の構造を観測できるin cell NMRが開発され、細胞内のタンパク質の物性は、試験管内の物性とは異なることが示された⁸⁾。これらの手法はタンパク質の構造情報を有するが、過渡的な構造が複数ある場合に応用が難しい。とはいえ、これらの観測技術革新により、細胞の内部も含めて、タンパク質のダイナミックな構造転移を精

Toward the Breakthrough in Protein Science

Kiyoto KAMAGATA

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

度よく観測できるようになってきた。

計算の技術にも大きな進展があった。D. Baker らは、特定の構造や機能をもつ人工タンパク質の設計に成功した⁹⁾。この成功は、アミノ酸配列と構造の関係式、さらには、アミノ酸配列と機能の関係式がわかり始めていることを示唆する。しかしながら、人工タンパク質の設計は現在も困難な課題の1つであり、今まで以上に精度のよい設計法の開発が望まれる。また、D.E. Shaw らは、タンパク質の分子動力学計算に特化した計算機を開発し、タンパク質のミリ秒の計算（水分子を含めた）を可能にした¹⁰⁾。従来の短い計算時間では現象論的な議論しかできなかったが、実験データと比較できるような定量的な議論を可能にした。そして、タンパク質の折りたたみや薬の結合過程を計算機上で再現することに成功した。彼らの研究は、力場の不確かさの問題は依然あるものの、計算機のパワーがあれば、タンパク質や薬の設計が分子動力学計算を用いてできることを示した。今後、計算機の処理能力がさらに上がり、計算時間がより短くなれば、多くの現象が計算機上で再現される時代が来るかもしれない。

4. タンパク質科学の将来

上述のように、さまざまな技術開発によって、タンパク質の動的な構造を観測でき、さらには、計算機上でその構造変化を再現できるようになってきた。これらの技術革新により、タンパク質の理解は深まりつつある。今後も、タンパク質の物性を丸裸にできるように、既存の方法の精度の向上、さらには、新規の方法の創出が必要不可欠である。

私たちが開発した1分子蛍光測定装置についていえば、時間分解能とシグナル・ノイズ比の向上が必要である。タンパク質の構造ゆらぎ運動はサブマイクロ秒から秒の広範囲な時間域で起こる。私たちの装置の観測時間領域はミリ秒から数10秒であるため、サブミリ秒のゆらぎ運動は観測されない。現在、タンパク質を基板に固定せずに、広時間域計測できる新規の1分子蛍光計測装置の開発を行っている。この装置開発を通して、タンパク質の折りたたみや機能にかかわる詳細なエネルギー地形が明らかにできると考えられる。

最近では、ABCトランスポーターなど解析が難しい膜タンパク質の分子機構、天然変性タンパク質の物性の解明が重要であると考え、1分子計測研究を開始した。予備実験の段階であるが、ABCトランスポーターは、ATPがない条件下でさえ複数の構造集団から

構成される複雑なエネルギー地形を示すことが明らかになりつつある。

一方、1分子蛍光計測にも弱点があり、一般的に色素間距離の情報に制限される。つまり、2点間距離以外の部分の構造はわからない。これらの欠点を補うためにも、1分子レベルでの構造解析が必要である。原理的に、AFMや走査型トンネル顕微鏡（STM）や電子顕微鏡やX線自由電子レーザーを使用すれば、1分子構造解析が可能である。私たちは、2次構造と側鎖の向きや種類まで同定できる分解能での構造情報の取得が重要であると考え、超高真空STMを使用した天然変性タンパク質の1分子構造解析の研究を開始した。この研究が1分子構造生物学の先駆的な研究になることを願っている。

最後に、社会に役立つタンパク質科学を作ることも重要である。エネルギー問題や疾患対策も含めたタンパク質科学には、タンパク質の人工設計の技術が不可欠である。1分子構造解析などの実験からの知見を応用して、新しい設計手法を作製することが私の最大の目標であり課題である。近年開発された技術を考えると、私たちが想像もしていない技術が開発される可能性は大いにありうる。近い将来、タンパク質科学が新しい展開をむかえることを期待したい。

文 献

- 1) Kamagata, K. *et al.* (2003) *J. Mol. Biol.* **332**, 1143-1153.
- 2) Kamagata, K. *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* **339**, 951-965.
- 3) Kamagata, K. *et al.* submitted.
- 4) Kinoshita, M. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10453-10458.
- 5) Koder, N. *et al.* (2010) *Nature* **468**, 72-76.
- 6) Shimizu, H. *et al.* (2008) *Cell* **132**, 67-78.
- 7) Sugase, K. *et al.* (2007) *Nature* **477**, 1021-1025.
- 8) Inomata, K. *et al.* (2009) *Nature* **458**, 106-109.
- 9) 鎌形清人ら (2011) *化学* **1**, 68-69.
- 10) Shaw, D. E. *et al.* (2010) *Science* **330**, 341-346.

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
 東京大学大学院理学系研究科で、学位（理学）を取得。大阪大学蛋白研研究員を経て、現職。
 研究内容：タンパク質の折りたたみと機能の1分子計測
 連絡先：〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1
 E-mail: kamagata@tagen.tohoku.ac.jp
 URL: <http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=34>