

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」

平成13年度採択研究代表者

佐々木 裕次

((財)高輝度光科学研究センター 主幹研究員)

「X線1分子計測からの*in-vivo*蛋白質動的構造 / 機能解析」

1. 研究実施の概要

蛋白質分子の動的構造情報/機能相関を詳細に解析するには、原子レベル以下の精度で*in vivo*動的1分子構造情報が安定に得られ、同時に1分子機能計測も併用可能なX線1分子計測法が最も有効である。本研究では、上記新計測法を機能性分子として注目される膜蛋白質分子の*in vivo*計測へ適用しその理解を進め、また本法と計算科学を合体させた全く新しい蛋白質構造決定法をも検討する。本研究が進展すれば、敏速な機能性蛋白質分子の構造・機能情報の取得を可能になり、医薬利用等への応用、並びに1分子技術、バイオ技術、そしてナノ技術との融合による新技術の創製をも可能となる。今年度は以下の研究項目を重点的に進展させたので記す。

- (a) アクチン分子動的挙動解析からナノ結晶標識効果を考察。
- (b) タンパク質1分子フォールディングプロセス計測と1分子計算。
- (c) GroES/EL系におけるATP分解過程のダイナミクス解析。
- (d) *in vivo* 及び*in vitro* Kチャネル動的挙動計測。
- (e) 可視吸収残基からの熱緩和過程における1分子動的挙動計測。
- (f) ナノ結晶作製技術の向上。

1.1 今年度の研究成果（上記重点項目順に説明）

(a) アクチン分子の動的挙動解析は、1ファイラメントレベルの運動情報が古くから研究対象として注目され蓄積されており、本プロジェクトのように新しい測定法を評価する上で非常に重要なサンプル系である。この系はファイラメント（Fアクチン）形状を保った状態で基板表面に固定するので、1つ1つの蛋白質分子（Gアクチン）はその影響がほとんどない。またファイラメント系だとどの方向から基板表面に吸着してもその分子方位は同値なので、分子の運動状態を考える時に方位を考慮しなくてよいという利点があることも理想的サンプル系と考える所以である。実験では、Mg系とCa系で実験し、蛍光分子であるファロイジンをファイラメント内に挿入する場合について分子の揺らぎ変化を計測した。その結果、ナノ結晶の反応サイト数が1つになった場合に限って、マクロな実験で知られていた結果と一致することが分かった。ナノ結晶の標識後の計測でも意味ある情報を取得できるという非常に良い例となった（論文投稿中）。

(b) タンパク質分子を人工的に作製するためには、セントラルドクマの最後のブラックボックスと言われるフォールディング過程の解明は非常に重要である。そこで、フォールディング過程の研究にすでに利用されているベータ2ミクログロブリンを用いたフォールディング過程の1分子計測を行い、ほぼ一連の実験を終了した。予想通り、より自由度の多きポリペプチド状態になれば分子内揺らぎが大きくなる。揺らぎ時の拡散定数が求まったので、それと理論的な関係を現在詰めている。加えて、単純なアルファヘリックスの構造分子による実験も開始した（アミノ酸19残基）。これは理論的な計算結果と厳密に比較検討することが可能であるので、その比較を現在進めている。このことより、本計測手段の最大の特徴であるナノ結晶の標識効果も定量的な数値を出すことができると考えている。

(c) タンパク質1分子の分子内構造変化は、多くの研究者が行っている可視域の1分子計測法で不可能（エネルギー移動法でできると言われているが信頼性がない）であるので、X線1分子計測のデモとして最適。ATP分子系のタンパク質分子GroEL/ES系を今年度は集中的に検討した。実験結果では、ATP（ADP）分子が吸着している状態では、熱的なブラウン運動が極端に減少することが分かった。これはATP分子等のヌクレオチドがGroELに結合した状態では、存在しない系に比べて14量体である同分子の分子間（相互作用）運動が拘束されることを示しており、この現象がシャペロニン機能発現になくってはならない現象ではないかと考察するに至った。現在、多種のヌクレオチド系において揺らぎ計測をより詳細に計測している。

(d) *in vivo* だけではなく *in vitro* 状態においてKチャンネル(KcsA)の動的挙動計測を進めた。昨年までの *in vivo* 計測の結果から、KcsAの動的挙動は予想していたものよりも極めて複雑なものであったために、まずは *in vitro* 状態での動的挙動を正確に把握しておくことが重要であると考え、*in vitro* 状態での実験を加えることにした。H16年半ばまで *in vitro* 状態の計測データが定量解析できるほどに蓄積される予定である。現在のところ把握している運動の特徴は、KcsAの細胞内ドメインの存在がKcsA自身の運動特性に影響を及ぼしているという点である。細胞内ドメインにセンサー的な部位があることも考慮すると、この運動の差異は非常に重要な生理的意味合いが含まれていると思われる。

(e) 可視吸収残基からの熱緩和過程における1分子動的挙動解析を新たに進めた。バクテリオロドプシン系の実験を進める過程で、光吸収を有するアミノ酸残基が光を吸収した際に、大きなブラウン運動を誘起している現象を発見したからである。実験系はGreen Fluorescent Protein (GFP) である。特に無輻射遷移の過程での光吸収は、ブラウン運動を励起する現象が明確に現れており、この現象の詳細な解析とその応用も視野に入れての検討を進めている。

(f) ナノ結晶作製技術の向上に関する研究は、本プロジェクトがスタートして以来の最重要テーマである。ナノ結晶の結晶性が向上すれば、それだけ小さいナノ結晶を標識するだけで運動が計測できるし、X線の照射強度も減少させることが可能となる。本年度は、結晶性を向上させる基板であるNaClの飽和蒸気圧を向上させることが、基板上で成長する金結晶の結晶性を極めて向上させることが分かった。つまり、真空状態化でアニーリング

するのではなく、高圧化でアニーリングすることが結晶性向上と基板上での金の並進的な拡散を減少させるので、より小さい結晶性の高いナノ結晶の作製が可能になったのである。今後より高圧条件下でのアニーリング可能な装置の作製を予定している。

2.2 今後の見通し

(a) アクチン分子とミオシン分子の相互作用を見る一番有名なモーターテアッセイ法を実行し、可視の1分子計測から得られた実験データと比較することで、X線1分子計測法の特徴をアピールする。**(b)** タンパク質分子のフォールディングプロセス観察では、単純なアルファヘリックス構造のフォールディングプロセスの解析を進める。**(c)** GroES/EL系ATP分解過程のダイナミクス解析のまとめを行い、ATP分解の素過程までも議論できるように条件設定をより詳細に設定する。**(d)** *in vitro*条件でのKチャンネル(KcsA)動的挙動解析を次期年度前半中にまとめ論文化する。その後、*in vivo*計測の実験結果を年度内にまとめる。**(e)** GFP等の光吸収過程における運動異常現象をまとめて論文化する。**(f)** ナノ結晶作製技術の向上では、より高圧下でのアニーリングを行う。また、可視1分子計測との併用実験を目指して、CdSeの完全ナノ結晶の作製も始める。

2. 研究実施内容

H15年度は以下の各実験系において進展があったのでここに記する。

佐々木グループ

本年度は、多くの実験系においてX線1分子計測の高精度ならではの実験結果が出始めた重要な年であった。昨年度から継続していたアクチン分子の分子挙動解析もナノ結晶標識効果にも言及できるパラメータを取得することができた。具体的には、ナノ結晶とそれを標識する蛋白質分子との反応部位の数である。1対1反応が理想的であることが証明された。タンパク質1分子のフォールディングプロセス観察も1分子計算との比較が具体的に前進し、より厳密な定量解析が可能な段階に入った。GroES/EL系ATP分解過程のダイナミクス計測では、ヌクレオチド反応におけるブラウン運動が、予想に反してブラウン運動を抑制するような効果があることもわかった。Kチャンネルの*in vivo*及び*in vitro*動的挙動計測では、予想以上に計測された運動が複雑なために*in vivo*解析が進んでいなかったが、*in vitro*状態での解析が進んだために、*in vivo*解析にも道が開かれた。また、バクテリオロドプシンの一連の実験から注目した可視吸収残基からの熱緩和過程における1分子動的挙動解析は、応用の面で非常に重要な実験系となると考えている。最後に、ナノ結晶作製技術の向上は、来年度の本格的な高圧条件下でのアニーリング処理に期待がふくらむ。

老木グループ

X線1分子計測をおこなうためにKcsAチャンネルに最適の実験条件を設定することが本年度の目標であった。まず実験効率を上げるために脂質平面膜を形成するための成功確率を上

げる条件を決めた。チャンネル側の条件としては、現在の時間分解能でチャンネル開閉を捉えるために、できるかぎりゲート速度を遅くしなければならない。同時にKcsAチャンネルの開確率がきわめて低いのでこのことも測定の障害になっていた。今回、開確率を大きく変化させ測定に適した条件にするための新しい方法を確立することができた。非電解質を細胞質側に高濃度加えることにより開確率が10%以下から50%以上に上昇した。この現象のメカニズムが選択的溶媒和によることを明らかにし、チャンネルの開閉構造に対する新しい手がかりを得ることができた。また単一チャンネル電流記録にたいするキネティクス解析からゲート機構についての新しい知見を得た。

金結晶をKcsAチャンネルに結合させるためにKcsA分子のさまざまな位置にシステイン残基を導入した変異型を作成・精製した。KcsAの膜貫通領域の構造は明らかになっているが、細胞質ドメインの構造は詳細なものは得られていない。したがって結合部位を導入するに当たって現在明らかになっている低分解能のものを基にする必要があった。重要なことは導入した部位が表面から金結晶がアクセス可能かという情報である。金結晶が実際に変異型KcsAチャンネルに結合することを確かめるためのスクリーニング法としてSPR (surface plasmon resonance) 装置を使った新たな方法を考案した。多大な試行錯誤の後、スクリーニング法として確立しつつある。

KcsAチャンネルを基板に固定するためのアミノ酸置換を細胞外ループ領域に導入し、X線1分子計測をおこなうことができた。

岡本グループ

本年度の主な成果を以下にまとめる。まず、1分子のX線実験解析のための小ペプチドにおいて拡張アンサンブル法に基づく分子動力学シミュレーションを実行している。 α ヘリックスを形成することが知られている、アミノ酸数19の小ペプチドにおいて、拡張アンサンブル法の一つである、レプリカ交換分子動力学法に基づくシミュレーションを実行した。特に、1分子X線実験解析のためにつける金のクラスターの寄与も考慮した。やっと、計算の準備が完了した。現在、1分子X線実験解析のためにつける金のクラスターの質量依存性を詳しく調べる、大規模拡張アンサンブルシミュレーションを実行している。

次に、我々が独自に開発した拡張アンサンブル法であるREMUCAとMUCAREMを厳密な溶媒効果を取り入れた (TIP3Pの水分子をあらわに取り入れた) アミノ酸数十個の小ペプチド系に適用することによって、広く使われているAMBER、CHARMM、OPLS、GROMOSなどの標準的なエネルギー関数 (力場) が蛋白質の立体構造予測が可能な程の精度を持つか否かを調べた (論文7)。この判定には、エネルギー極小状態に留まらず、広く構造空間をサンプリングすることができる、拡張アンサンブル法の使用が必須であり、我々の新手法の開発によって、初めて現実的な問題になったと言える。具体的には、実験で α ヘリックスを形成することが知られている、C-peptide (13残基) と β ヘアピンを形成することが知られているG-peptide (16残基) を半径22~26Åの水の球に配置して、ランダムな初期構造から拡張アンサンブルシミュレーションを実行した。力場によって、振る舞いが大きく違うこ

とが分かった。二次構造（ α ヘリックスまたは β シート）の形成される傾向を温度の関数として求め、完璧な力場が存在しないと結論した。

よって、我々は最適な力場パラメータを独自に開発することにして、新しいエネルギーパラメータの最適化法を提案した。そして、上のC-peptideとG-peptideにおいて、それぞれ正しい二次構造がランダムな初期構造から始める徐冷分子動力学シミュレーションによって確かめた。例えば、AMBER94においてオリジナルと最適化された力場パラメータの比較をおこなった。オリジナル力場が α ヘリックスを作りすぎるのに対し、最適化された力場では、C-peptideでは α ヘリックスが、また、G-peptideでは β ヘアピンが適度に形成されて、力場が改良されていることが分かった。

次に我々は、レプリカ交換モンテカルロ法に基づく、膜タンパク質の立体構造予測法を新たに提案した。二本のヘリックスからなる膜たんぱく質である、glycophorin Aにおいて、実験で示唆される構造とそっくりな構造が予測できた。

最後に、新しい拡張アンサンブル法として、定圧定温アンサンブル（isobaric-isothermal ensemble）のマルチカノニカル法版を開発したので、紹介する。この手法では、エネルギー空間ばかりでなく、体積空間でもランダムウォークが起こり、一回のシミュレーションの結果から、任意の温度と圧力におけるアンサンブル平均を計算することができる。よって、タンパク質の高圧変性の研究などに有効な手法である。

3. 研究実施体制

佐々木グループ

- ① 研究分担グループ長：佐々木 裕次（(財)高輝度光科学研究センター、主幹研究員）
- ② 研究項目：X線1分子計測法の最適化、1分子、ナノ技術、バイオ関連技術の開発
ミメティック分子の開発

老木グループ

- ① 研究分担グループ長：老木 成稔（福井大学、教授）
- ② 研究項目：電気生理実験、ミメティック分子設計

岡本グループ

- ① 研究分担グループ長：岡本 祐幸（分子科学研究所、助教授）
- ② 研究項目：計算科学、特に新しい立体構造決定法関連

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

○ Yasuaki Okumura, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki

“Dispersive One-Dimensional (Mo/Si) Nanocrystals for Single Molecular Detection System using x rays” Journal of Applied Physics 92, 7469-7474

(2002). 2002. 12. 15号

- Kamatari, Y., Dobson, C. M. and Konno, T. :
“Structural dissection of alkaline-denatured pepsin.” *Protein Sci.* 12: 717-724, 2003.
- Shimizu, H., Toyoshima, C. and Oiki, S:
“Interaction between Tetraethylammonium and Permeant Cations at the Inactivation Gate of the HERG Potassium Channel.” *Jpn. J. Physiol.* 53, 25-34, 2003
- Berthomieu, P., Nublat, A., Brackenbury, W. J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Conéjéro, G., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Véry, A.-A., Sentenac, H. and Casse, F. :
“Functional analysis of *AtHKT1* in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance.” *EMBO J.* 22: 2004-14, 2003.
- Futaki, S., Zhang, Y., Kiwada, T., Yagami, T., Oiki, S. and Sugiura,
“Gramicidin-based Channel Systems for the Detection of Protein-ligand Interaction.” *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1343-50, 2004.
- Niraula TN, Konno T, Li H, Yamada H, Akasaka K, Tachibana H. : “Pressure-dissociable reversible assembly of intrinsically denatured lysozyme is a precursor for amyloid fibrils.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 4089-93, 2004
- G. La Penna, A. Mitsutake, M. Masuya, and Y. Okamoto,
“Molecular dynamics of C-peptide of ribonuclease A studied by replica-exchange Monte Carlo method and diffusion theory,” *Chem. Phys. Lett.* **380**, 609-619 (2003).
- B. A. Berg, H. Noguchi, and Y. Okamoto, “Multi-overlap simulations for transitions between reference configurations,” *Phys.Rev. E* **68**, 036126 (11 pages) (2003).
- Y. Sakae and Y. Okamoto, “Optimization of protein force-field parameters with the Protein Data Bank,” *Chem. Phys.Lett.* **382**, 626-636 (2003).
- H. Kokubo and Y. Okamoto, “Prediction of transmembrane helix configurations by replica-exchange simulations,” *Chem. Phys.Lett.* **383**, 397-402 (2004).
- H. Okumura and Y. Okamoto, “Monte Carlo simulations in multibaric-multithermal ensemble,” *Chem. Phys.Lett.* **383**, 403-408 (2004).
- K. Murata, Y. Sugita, and Y. Okamoto, “Free energy of DNA base stacking studied by replica-exchange umbrella sampling,” *Chem. Phys.Lett.* **385**, 1-8 (2004).
- T. Yoda, Y. Sugita, and Y. Okamoto, “Comparisons of force fields for

proteins by generalized-ensemble simulations,” *Chem. Phys. Lett.* **386**, 460–467 (2004).