

「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。本法を膜蛋白質分子の*in vivo*計測へ適用し、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検討する。本研究は敏速な蛋白質分子の構造・機能情報の取得を可能にすることで、医薬利用等とならび1分子技術、バイオ技術、そしてナノ技術との融合をも目指す。

本年度達成された研究項目を下記に示す。

- (a) X線放射圧による力発生の確認実験。
- (b) GroES/EL系ATP分解過程のダイナミクス1分子計測。
- (c) 可視吸収残基からの熱緩和過程における1分子動的挙動計測とその応用。
- (d) ナノ結晶作製技術の向上。
- (e) *in vitro* K (KcsA) チャネル動的挙動1分子計測。
- (f) Kチャネルの開構造予測のための新しい方法論の提案。
- (g) Kチャネル細胞内ドメイン構造の新しい解析法の確立。
- (h) タンパク質1分子フォールディングプロセスの計算と計測。

2. 研究実施内容

(あ) 佐々木G (関連項目(a, b, c, d, e, h))

本年度の進歩は、X線の放射圧の確認実験、GroES/EL系ATP分解過程、そしてK (KcsA) チャネル動的挙動1分子計測が主な計測内容であった。特にX線の放射圧現象の確認は予想していなかった成果であった。X線照射時の放射圧現象が、その極めて弱い力(aNレベル)であるが故に測定できると予想されていなかった。基板に吸着された生体1分子運動の僅かなゆがみから検出された(論文投稿中)。この正常なブラウン運動からの僅かなずれを検出できたX線1分子計測の精度の高さを証明する代表的な結果になると自負する。この現象は将来の生体系分子トラッピング技術へと発展する可能性を秘めていると考えているので、その具体的な応用先をこのプロジェクト期間内に示したい。またナノ結晶作製

研究から、現在注目されている量子ドット（CdSe等）の研究に利用できるような技術も数多く蓄積できた。新規ナノプローブへの応用を検討している。

Kチャンネルの運動計測にも大きな進展があった。平面膜内での運動計測をより確かなものにするために、第一段階の実験としてチャンネル分子を基板に固定した状態でX線1分子計測実験を今年に行った。KcsAチャンネルはホモ4量体であるため、点変異によっても4箇所対称な位置に変異を導入できる。細胞外に飛び出たループ領域にリジン残基を導入し基板に固定した。この状態ではチャンネルは細胞外ループの4箇所ですべて基板に結合し、細胞内ドメインを上に向けた配向にある。細胞内ドメインにあるC末端にシステイン残基を導入し金結晶を結合させた。イオン流を遮断するゲート（膜貫通領域にある）の動きが細胞内ドメインに伝達すれば、その動きを観察できると予想したからだ。実験結果はまさに予想が的中し、ゲートの動きに関連した動きを観察することに成功した。重要な点はゲートをコントロールするpHによって動きに大きな差が見られたことである。このチャンネルのpHセンサーは細胞内ドメインにあると予想されているので、センサーからゲートへの動きの伝達過程が観察された可能性がある。またゲートの動きを止めるブロッカーの存在下では金結晶の動きが著明に抑制された。以上の実験結果からゲートの動きが細胞内ドメインに伝達しているようだ。

この仮説を検証するために、他の位置へ金結晶結合部位を導入した。細胞内ドメインを削除してもチャンネル活性があることはすでに電気生理学的方法で確認している。ゲートに直近の位置に結合部位を導入するとゲートの動きを観察することができなかった。ただこれは、金結晶が結合することによって4つのゲートを固定してしまった可能性がある。ゲートの動きを止めずに観察可能な位置を検索中である。

これと並行して最終目的である単一チャンネル電流記録とX線1分子計測法の同時記録のための実験系を構築中である。予想もしなかった数々の問題点に遭遇はしたが、工夫を重ねて一つ一つ解決できた。例えばSPRING-8というノイズが渦巻く巨大パワーの環境にあってピコアンペアという微小電流を測定する必要がある。さまざまな改良の結果、現在までに通常の電気生理学の実験室並みのノイズレベルまで低減させることに成功している。

今後の戦略では電位依存性チャンネルを実験対象とすることである。電位依存性チャンネルこそ膜蛋白質のもっとも重要な特徴を備えている。リガンド作動性チャンネルは膜環境になくともリガンドを結合しゲートを開閉することができるが、電位依存性チャンネルは膜電位変化という物理的現象がゲートを制御しており、膜という環境でのみ意味のある働きをする。もう一つの利点は電気生理学の実験によって膜電位を自由にコントロールできるため動きをコントロールできるだけでなく、動きをフィードバックさせてチャンネルゲートをコントロールできることである。

GroES/EL系ATP分解過程のダイナミクス計測でも、多くの生体反応ステップで動的計測が可能となった。大腸菌由来の分子シャペロンGroELはATP加水分解活性を伴い、蛋白質の構造形成を補助する。ところが、ヌクレオチドの結合・加水分解による影響に関しては不明な点も多く残されている。中でもATPの結合とGroELの構造変化の関係については現在で

も様々な提唱がされている。本実験では変異型GroEL A133Cを用いて、Cys部位にナノ結晶を修飾することによって、ヌクレオチド結合部位近傍の揺らぎを観測した。我々はヌクレオチド存在下と非存在下でナノ結晶から得られる回折点の動きに注目した。その結果、ヌクレオチド非存在下では回折点が一方向に移動するのに対して、ヌクレオチドが存在した場合、回折点は振幅を持った軌跡を示した。これは、ヌクレオチドが結合していない時、GroEL分子には分子内に空間的余裕がありブラウン運動による大きな揺らぎを生じており、一方ヌクレオチドが結合すると分子内の構造安定性が増し、ブラウン運動が抑制され、より小さい振幅をもった運動に変わるのではないかと考察された。つまりこれはヌクレオチドの結合が分子の揺らぎを制御しているのではないかと考えている。もし、ヌクレオチドによってGroELの動きを制御出来るようになれば、有意な物質をGroEL内部に包括させ、分子カプセルの役目をさせるといった医薬的利用にも応用できるのではないかと期待している。

(い) 老木G (関連項目(e, f, g))

KcsAチャンネルでは閉状態の立体構造しか得られていないが、単一チャンネル電流測定（脂質平面膜法；tip-dip法）から、チャンネル分子の開構造を予想することができた。開構造の解明に不可欠なイオン透過路のカットオフサイズを次のような方法で明らかにした。透過カリウムイオン濃度は一定に保ちつつ高濃度非電解質を添加すると、チャンネルの開確率が大きく変化した。この効果は、チャンネル分子の中心空洞に非電解質が到達することによって明らかになった。さまざまな非電解質（スクロース・ラフィノース・ソルビトール・エチレングリコール・グリセロールなど）を使用することによって中心空洞のカットオフサイズが直径約10Åであることを決定した。開状態の構造が求められているKvAPチャンネルをテンプレートとして、ホモロジーモデリングによってKcsAの開構造を求めた。このモデルは実験結果と一致する透過路構造を持つことが明らかになった。開閉両構造を得ることによって、構造変化の軌跡を予想することが可能になる。また、膜寛通領域と細胞内ドメインの関係についても手がかりを得ることができた。

本研究プロジェクトの中心的方法論であるX線1分子計測法では、KcsAチャンネルに金結晶を結合させるために、システイン残基を最適な部位に導入する必要がある。その候補として細胞内ドメインを選んだ。ところがKcsAの細胞内ドメインはEPRの結果をもとにした予想構造が得られているに過ぎず、金結晶の結合部位を決定する情報に乏しい。そこで導入したシステイン残基の金結晶との反応性をスクリーニングする新しい方法を開発した。金コーティング表面への結合性を表面プラズモン共鳴法で測定した。システイン残基を導入した数10種類のKcsAチャンネルをこの方法で定量的に評価することによって、細胞内ドメインの表面接近性と金結晶との反応性を明らかにすることができた。接近した一次構造上での位置で反応性が大きく変化することから、2次構造のパターンが読み取れ、全体的な立体構造を予想することができた。金基板への結合構造を原子間力顕微鏡によって観察し、島状に分布していることが明らかになった。

また、上記の実験用いた多くの変異体を用いてKcsA分子を石英ガラス基板にさまざま

なオリエンテーションで結合させることができるようになり、1分子計測法でチャンネルゲートの振る舞いを捉えることに成功した。細胞内ドメインのC末端に金結晶を結合したものでは、開確率の低い中性pHでは一方向のゆらぎが観察された。一方、高开確率の低pHではゆらぎに加えて新たな方向の運動が観察された。さらに、細胞内ドメインを酵素的に削除したチャンネルに対して実験を行い、ゲーティングに伴う細胞内ドメインの役割について検討した。

回折点画像を解析するために粒子トラッキングソフトウェアを導入するとともに、画像解析の専門家と議論し、新しいプログラムの開発を計画した。それとは別に、得られた回折点座標の動きやスポット間の動きの相関を解析するための新しい方法を考案し、データ処理した。これらの結果を総合し、チャンネル分子のさまざまなモードの動きを明らかにしつつある。

(う) 岡本G (関連項目(h))

本年度の主な成果を以下にまとめる。現在、1分子のX線実験解析のための小ペプチドにおいてレプリカ交換分子動力学法シミュレーションを実行中である。 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 (Ac-YGKAAAKAAKAAK-CONH₂) のシミュレーションを以下の手順で実行した。まず、実際に α ヘリックスを再現できるかどうかを確認するために、何も拘束を与えない小ペプチドを半径27Åの水の球の中に配置して、ランダムな初期構造からシミュレーションを行った(ステップ1)。次に、X線1分子解析では小ペプチドのN末端を基盤に固定するが、その影響をみるために、N末端を固定するシミュレーションを行った(ステップ2)。最後に、1分子X線実験解析では小ペプチドのC末端のシステインに金のクラスターをつけるが、その寄与をみるためにC末端のシステインにおける硫黄分子の質量を大きくしてシミュレーションを行った(ステップ3)。実験では計測が難しい分子のミクロスコピックな情報を得るために全原子モデルを採用しているため、大規模なシミュレーションとならざるを得ないのだが、上記のステップのうち、1、2は完了しており、3についても精力的にすすめている最中である。

ステップ1で得られた大半の安定構造は α ヘリックス構造となった。安定構造の一つのスナップショットをfigure 1に示す。 α ヘリックス構造を再現できるのは、通常シミュレーションとは異なり、エネルギー極小状態に留まらず、広く構造空間をサンプルすることができる、拡張アンサンブル法を用いているからである。ステップ2においても同様に α ヘリックス構造が多く見られた。

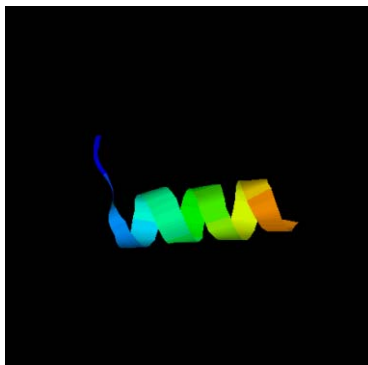


Figure 1 Snapshot

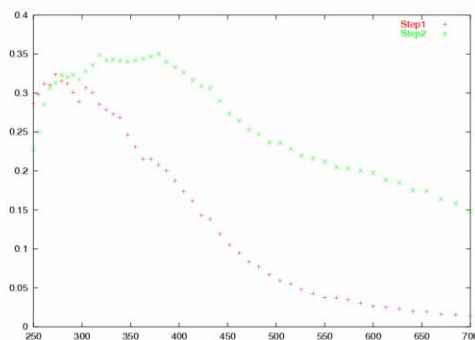


Figure 2 Temperature vs Helicity

次に、この小ペプチドにおける α ヘリックスの強度（壊れにくさ）について調べた。温度が高ければ、 α ヘリックスは壊れやすくなり、ヘリックス・コイル転移温度を境に α ヘリックスは壊れる。 α ヘリックスの形成される傾向（ヘリックスを形成している確率）を温度の関数として求めたのが、figure 2である。ステップ1（赤色）ではヘリックス・コイル転移温度は400K周辺で見られたのに対して、ステップ2（緑色）では、高温においても α ヘリックス構造を保持し、ヘリックス・コイル転移点は見られなかった。それは、N末端を固定しているため、小ペプチドの動きが制限され、小ペプチドのC末端の動く範囲が限定され、 α ヘリックスが壊れにくくなるからである。

さらに、小ペプチドの動きのゆらぎについて調べるために、シミュレーションで得られたトラジェクトリを用いて主成分解析を行った。その結果、ステップ1と比較して、ステップ2のトラジェクトリがとる配置空間が狭くなっていることを確認できた。ステップ1ではN末端とC末端の両端が自由にゆらいでいるため、ダイナミックな運動が見られたのに対して、ステップ2の方は、N末端が固定されているため、N末端のゆらぎは制限され、 α ヘリックスを保持した状態での運動が見られた。また、主成分解析を用いて自由エネルギー面を構築し、その温度による変化を見ることにより、ヘリックス・コイル転移の様子をみるのが可能となる。現在は、これらの自由エネルギー面の解析をすすめている最中である。ヘリックス・コイル転移のプロセス、さらには、X線1分子計測において、それらがどのように変化するか、明らかにすることが期待できる。

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（原著論文）発表

- H. Kokubo and Y. Okamoto, "Prediction of membrane protein structures by replica-exchange Monte Carlo simulations: case of two helices," *J. Chem. Phys.* **120**, 10837-10847 (2004).
- H. Kokubo and Y. Okamoto, "Self-assembly of transmembrane helices of bacteriorhodopsin by a replica-exchange simulation," *Chem. Phys. Lett.* **392**, 168-175 (2004).
- A. Mitsutake and Y. Okamoto, "Replica-exchange extensions of simulated tempering method," *J. Chem. Phys.* **121**, 2491-2504 (2004).
- H. Okumura and Y. Okamoto, "Monte Carlo simulations in generalized isobaric-isothermal ensembles," *Phys. Rev. E* **70**, 026702 (14 pages) (2004).
- S.G. Itoh and Y. Okamoto, "Multi-overlap molecular dynamics methods for biomolecular systems," *Chem. Phys. Lett.* **400**, 308-313 (2004).
- T. Yoda, Y. Sugita, and Y. Okamoto, "Secondary-structure preferences of force fields for proteins evaluated by generalized-ensemble simulations," *Chem. Phys.* **307**, 269-283 (2004).
- Yasuaki Okumura, Toshihiko Oka, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Dynamical observations of membrane proteins: the case of Bacteriorhodopsin"
Proc. 8th international Conference on Synchrotron. Rad. Instrum 2004.5
(1174-1177)
- Yasuaki Okumura, Takuya Miyazaki, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Fabrications of dispersive gold one-dimensional nanocrystals using vacuum evaporation" *Thin Solid Films* 2004.7
- Yasuaki Okumura, Toshihiko Oka, Mikio Kataoka, Yoshio Taniguchi, Yuji C. Sasaki
"Picometer-scale dynamical observations of individual membrane proteins: the case of Bacteriorhodopsin" *Phys. Rev. E* **70**, 1(2004)
- Yuji C. Sasaki, Yasuaki Okumura, Noboru Ohishi
"Dynamical observations of local bio-molecular sites using

nanocrystals ”

Proc. 8th international Conference on Synchrotron. Rad. Instrum 2004
(1023-1026)

- Konno, T., S. Oiki, K. Hasegawa and H. Naiki: Anionic contribution for fibrous maturation of proto-fibrillar assemblies of human tau repeat domain in a fluoro-alcohol solution. *Biochemistry*. 43, 13613-13620, 2004.
- Konno, T., T. Morii, A. Hirata, S. Sato, S. Oiki, and K. Ikura: Covalent blocking of fibril formation and aggregation of intracellular amyloidogenic proteins by transglutaminase-catalyzed intramolecular cross-linking. *Biochemistry*. 44, 2072-2079, 2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数 : 1件 (CREST研究期間累積件数 : 1件)