

「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 放射光研究所 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す。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します。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目指します。

2. 研究実施内容

H14年度は、老木グループや岡本グループとの本格的共同研究の開始の年と位置づけ、X線1分子計測法のタンパク質分子運動計測への最適化等の研究を進展させると共に、加えて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

(a) X線1分子計測法はナノ結晶を生体分子へ標識しなければならない。本プロジェクトは、その効果を色々な実験結果と計算結果から把握し、できるだけ影響の少ない条件下での計測を追及している。実験方面での影響評価では、H13年から進めているアクチンフィラメント系の実験結果がまとまった(論文準備中)。この系は、生体分子を表面に固定する際の影響がほとんどないと確認されている。また、フィラメント系だど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。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ィ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。

(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(b2m)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(論文準備中)。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今詰めている。反省点としては、分子が複雑すぎたのもう少し単純な（例えば、単純なアルファヘリックス等）構造分子を選んで、pHをかなりふって実験をもう一度行なってみたいと考えている。

(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。以前、ミオシン頭部の構造変化計測を行なって、ATP分子の存在、非存在条件下で、はっきりとした構造揺らぎの違いを測定したが、基板の固定の問題があるとして信頼をあげる工夫を行なった。今までは直接基板にミオシン分子を固定していたが、今度はアクチンファイラメント上に固定。これだとin-vivo状態に近く問題点が解消される。実験を継続中である。

また、同じATP分子系のタンパク質分子でGroEL/ES系は有名であるが、この分子の構造はミオシンのATP機能ドメインと明らかに構造の違いがあることが知られており、ATP分子に関わる分子内揺らぎにどのような違いができるかも実験しているところである。

(d) 結晶性の良いナノ結晶の作製はX線1分子計測の生命線である。基本は結晶性を向上させるためのアニーリング温度をできるだけ高く、結晶径はできるだけ小さくである。温度を上げると、金原子の表面拡散による結晶径の肥大化が起こる。そのために最近では高融点化合物である酸化アルミニウムを0.3nm蒸着している。これを行なうと結晶性が良くて粒径（15-25nm）のそろったナノ結晶ができることがわかった。また、実験装置的にも放射光のビーム径を従来の直径0.2mmから0.03mmに細くすることで非常にS/Nの良いデータが得られることが確認されて、アニーリングなしでもナノ結晶が確認できることが判明した。画期的なことである。

老木グループ

本年度はSPRING-8での実験を可能にする装置開発と、測定対象となるチャンネル分子の準備に全精力を傾けた。装置開発の要点は、膜上のチャンネル分子を照射するビームが、可能な限り最短の水層を通過できるようなチェンバーを設計することである。背景ノイズを抑えるために通常のガラス容器ではなく石英ガラスを使用するというので、チェンバー作製上さまざまな困難があった。さらに、この狭い水層にむけて、チャンネル分子を保持した膜を移動・固定させるために新しいマニピュレータを開発した。脂質平面膜法の変法であるtip-dip法を適用し、実際の測定が可能となった。測定対象としてKcsAチャンネルを選んだ。

このチャンネルは立体構造が明らかになっているだけでなく、極めて安定な構造をもち、チャンネル特性に関する情報が蓄積しているからである。HisタグをつけたKcsAチャンネルを大腸菌で大量発現させ、精製したものを脂質平面膜法でチャンネル活性を測定した。さらに、金クラスターを結合させるために遺伝子工学的にシステイン残基をC末端に導入した。チャンネルのゲート特性が金クラスターの添加で変化することを確認した。

岡本グループ

平成14年度はX線による一分子測定の実験結果を解析するための計算機シミュレーション手法として最適のものを準備することを目指した。そして、拡張アンサンブル法と総称される手法が有効であることが分かってきたが、特に我々が3年ほど前に独自に開発した新しい拡張アンサンブル法である、レプリカ交換マルチカノニカル法とマルチカノニカルレプリカ交換法が本プロジェクトにおける計算機シミュレーションの問題に適していることが分かってきた。アミノ酸数が5個の小ペプチド系では、上の2手法がほとんどそのまま有効であるが、アミノ酸数が17個ぐらいになると、一回の適用では不十分で、まず、マルチカノニカルレプリカ交換法を数回繰り返して適用することによって、レプリカ交換マルチカノニカル法の重み因子が得られることが分かった。そして、ペプチド分子1個と水分子数千個含むような複雑系においても、これら2手法が有効であることが判明した。現在、本プロジェクトにおけるX線の一分子測定の実験の系における、上の拡張アンサンブルシミュレーションの準備を進めている段階である。

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（福井医科大学、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（岡崎共同研究機構 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
なし
- (2) 特許出願
なし