

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 16 年度採択研究代表者

高橋 聡

(大阪大学蛋白質研究所 助教授)

「蛋白質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立」

1. 研究実施の概要

本研究は、蛋白質の折り畳み運動を一分子レベルで観察する実験的手法と、得られた一分子の時系列データを解析する理論的手法を開発し、蛋白質の折り畳み運動の特性を理解することを目的として計画された。この目的を達成するために、大阪大学(高橋グループ)、広島大学(三本木グループ)、神戸大学(小松崎グループ)にそれぞれ研究グループを形成し、I) 一分子を観察する新しい実験技術の開発と観測(高橋グループ)、II) 一分子観察に適した蛍光ラベル化蛋白質の製作(三本木グループ)、III) 一分子観察実験のための新しいデータ解析手法の開発(小松崎グループ)、という個別テーマを設定した。さらに、三つのグループ間で議論を重ねることで、異なる研究グループで得られた知見の相乗効果による成果を期待した。

平成 17 年度の研究実施の概要は以下の通りである。高橋グループが担当した第一のテーマでは、蛋白質試料がキャピラリー流路を一分子レベルで流れる過程を、蛍光強度の変化から検出する手法の開発を行なった。一分子観察のためのさや流セルをはじめとする数々の装置上の改良を導入し、一分子データの取得を容易にする手法を開発しつつある。三本木グループが担当した第二のテーマでは、多種多様な生物由来のシトクロム *c* を遺伝子工学の手法で調整することを可能にし、各試料の安定性やバルクでの折り畳み特性の観測を進めている。小松崎グループが担当した第三のテーマでは、一分子時系列情報からその背後に潜む系の状態空間の動的構造を推定するための解析手法を、数々の新しいアイデアをもとに開発している。

以上のグループごとの努力の他に、グループ間の研究進度を半年に一度ずつ開催し、未成熟の結果やアイデアを議論する機会を持った。このように、本研究は目的に向けて成果を挙げつつある。平成 18 年度以降は、グループ間の議論だけではなく、実際の共同研究を展開することで新しい展開が期待される。

2. 研究実施内容

I) 新しい一分子観察法の開発と折り畳み運動の測定（高橋グループ）

蛋白質の折り畳みダイナミクスを一分子レベルで観察する手法の開発が高橋グループの研究テーマである。平成16年度に引き続き、17年度も実験装置の開発とデータ取得条件の最適化を検討した。具体的には、以下に示す1) および2) の装置開発を行なった。さらに、3) の観測を行ない、開発した装置の性能を確認した。

1) 一分子観察システムの開発：一分子運動をサブミリ秒の時間分解能で観測するシステムとして、レーザーとイメージインテンシファイアー、及び CCD カメラによる系を構築した。また、レーザー光を変調することでデータに時間マーカを入れるための E0 変調素子を導入した。さらに、ミリ秒の時間分解能で長時間の一分子データを観測するための別の検出システムも構築した。このシステムでは、ゆっくりと試料をセルに流し、EMCCD カメラにより長時間の連続読み出しを行なう手法を採用した。

2) 一分子の蛍光観察のための「さや流セル」の開発：一分子レベルの試料を扱うために、フローセル内面に試料が吸着を起こさずに、一定流速で流れることが必要である。また、蛍光の集光効率の良い顕微レンズを使うために、試料はキャピラリーセルの中心の限られた空間内を流れる必要がある。そのため、セルの中心部分にのみ試料を流すためのさや流セルを開発した。特に、ベイバイオサイエンス社（神戸）に依頼し、セルソーターという装置に使われるさや流セルを、特別に我々の実験目的に合うようにデザインした。このセルを用いることで、試料の吸着の問題をある程度回避できるようになった。また、被写体深度の浅い顕微レンズを用いても、焦点位置に分子を流すことが可能になった。

3) 平衡条件下における折り畳み過程の一分子観測：三本木グループにより供給されたシトクロム *c* に蛍光色素をラベルし、平衡条件下で折り畳み転移の観察を行った。得られた一分子の蛍光トレースは、様々な強度の間を比較的ゆっくりと行き来した。蛍光強度の頻度分布を計算したところ、集団変性観察から推定された N、I、U 状態に対応する三つのピークが確認された。ピーク分布のグアニジン濃度依存性も、分子集団観察の結果と一致した。従って、今回観察された蛍光強度トレースは、ラベル化試料の特性を正しく反映すると推論できた。

以上のように、我々は一分子の蛍光観察に成功したが、一分子を観察することは現状では大変困難な実験であり、データを再現することが容易ではないという問題が残されている。現在、さまざまな角度から実験条件を検討し、一分子観測を難しくする因子の解明を進めている。

II) 一分子観察に適した蛍光ラベル化蛋白質の作製（三本木グループ）

三本木グループでは、本プロジェクトで観測に用いるシトクロム *c* の作製を目的とした。具体的には、多種多様な生物由来のシトクロム *c* を遺伝子工学的手法によって調整して蛍光ラベル標識を可能にし、さらに、これらのシトクロム *c* の構造と安定性の関係を多分子

の系で調べ、折り畳み運動との関連性を明らかにすることを目的とした。

実験に用いるシトクロム *c* は、その遺伝子が大腸菌で発現させて調製した。三本木グループでは、すでに外来性のシトクロム *c* を大腸菌で適切に発現できる系を構築していた。平成 17 年度は、本実験系を適用して変異型酵母シトクロム *c* を調整し、高橋グループによる一分子観察実験に供した。また、熱に対する安定性が大きく異なるその他のシトクロム *c* を大腸菌で発現させる際に、用いる菌株によって発現量が変動することを見出した。大腸菌の培養条件の検討と併せて、発現量の最適化を図ることができた。さらに、円二色性分光計によって、各種シトクロム *c* の安定性の評価を行った。

以上のように、平成 17 度は一分子観察に用いる変異酵母シトクロム *c* を作製する努力を通して、変異導入のデザイン方法と作製手順を確立した。これらの技術は、今後他のシトクロム *c* にも適用可能と思われる。したがって、全体計画を大きく①実験と②解析に分けた場合、①の準備が完了したことになる。

III) 一分子観察実験のための新しいデータ解析手法の開発（小松崎グループ）

小松崎グループでは、一分子計測で得られた実験データを解析し、情報を得るための手法の開発を担当した。実際の一分子観察では、色素分子の退色などの制約により長い時系列データを得ることができない。そのため、単純な解析理論を実際の時系列データに適用しても、系の状態空間に関する情報を引き出すことが難しい。これらの問題意識に基づき、平成 17 年度は以下の解析手法の開発を行ない、一分子の時系列データに基づいて、背後に存在するエネルギー地形ないしは状態空間を推定することを目的とした。

1) 一分子時系列から系の動的構造を再構成する解析手法の開発：観測時間が短い状況下では局所平衡が成立する保証はない。局所平衡を前提としない“状態”を定義し、その状態間の反応遷移ネットワーク構造を構成する解析理論を開発した。熱浴との摩擦係数が大きく局所平衡が期待される場合とそうでない場合の 2 種の 46 ビーズタンパク質モデルにおける末端間距離の時系列情報に対しこの方法論を適用しその有用性を検討した。その結果、熱浴との相互作用が小さい（大きい）場合には、状態間遷移に非ランダム（ランダム）なネットワークが構成され、一分子時系列データから分子レベルにおける動態記憶を表現できることが判明した。また、遷移の動的規則性に関する基礎理論も展開し、遷移の統計性が出現するための数理構造を明らかにした。

2) 時空間スケールの異なる階層的ダイナミックスの解析手法の開発：ウェーブレット多重解像度解析などを用いて、時空間スケールの異なる階層的ダイナミックスを抽出する方法を開発した。46 ビーズタンパク質モデルにおける構成原子の速度の時系列情報へ適用し、各階層毎に異なる“温度”を定義し、変性した状態 (D) から折れ畳んだ構造 (N) への転移において、低波数成分群から高波数成分群へのエネルギーの流れが、逆に N から D への転移においては逆のエネルギーの流れが存在することなどを見出した。また、生体分子の構造変化と生体分子「近傍」の水の異常拡散を評価する解析手法を開発した。

3) 自由エネルギー地形を推定する時系列解析手法の開発：エネルギー障壁の高低や観測時間に依らずにすべて（少なくとも局所的に）平衡統計に従うことを前提とし、一分子時系列情報のみから観測時間に依存する“状態”概念に基づく多次元自由エネルギー地形を構成する手法を開発した。この方法では、系が経巡る各状態の分布関数を自己無撞着に決定し、各状態に滞在する滞在確率から対応する（局所的な）自由エネルギー値を推定する。また、異なる状態間を横断する遷移確率から対応する活性化自由エネルギーを推定する。46 ビーズタンパク質モデルの末端間距離の時系列情報に適用し、Folding 温度および Collapse 温度における多次元 “自由エネルギー” 地形の特徴を再現することを示した。

3. 研究実施体制

高橋グループ

- ① 研究分担グループ長：高橋 聡（大阪大学、助教授）
- ② 研究項目：
 - 新しい一分子観察法の開発と折り畳み運動の測定

三本木グループ

- ① 研究分担グループ長：三本木 至宏（広島大学、助教授）
- ② 研究項目：
 - 一分子観察に適した蛍光ラベル化蛋白質の作製

小松崎グループ

- ① 研究分担グループ長：小松崎 民樹（神戸大学、助教授）
- ② 研究項目：
 - 一分子観察実験のための新しいデータ解析手法の開発

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Uzawa, T., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Takahashi, S., Akiyama, S., Fujisawa, T. “Time-Resolved Small Angle X-ray Scattering Investigation on the Folding Dynamics of Heme Oxygenase: Implication of the Scaling Relationship for the Submillisecond Intermediates of Protein Folding” *J. Mol. Biol.* **357**, 997-1008, (2006).
- Shintaku, M., Matsuura, K., Yoshioka, S., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. “Absence of a detectable intermediate in the compound I formation of horseradish peroxidase at ambient temperature” *J. Biol. Chem.* **280**, 40934-40938, (2005).
- Kimura, T., Akiyama, S., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Fujisawa, T., Takahashi, S. “Specifically collapsed intermediate in the early stage of the folding of ribonuclease A” *J. Mol. Biol.* **350**, 349-362, (2005).

- Kimura, T., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Takahashi, S., Konno, T., Akiyama, S., Fujisawa, T. “Specific collapse followed by slow hydrogen-bond formation of beta-sheet in the folding of single-chain monellin.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 2748-2753, (2005).
- Wadai, H., Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kanno, T., Kawai, T., Naiki, H., Goto, Y. “Stereospecific amyloid fibril formation of a peptide fragment of β 2-microglobulin” *Biochemistry*, **44**, 157-164, (2005).
- Kameda, A., Hoshino, M., Higurashi, T., Takahashi, S., Naiki, H., Goto, Y. “NMR characterization of refolding of β 2-microglobulin trapped by prolyl cis-trans isomerization” *J. Mol. Biol.* **348**, 383-397, (2005).
- Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kawai, T., Naiki, H., Goto, Y. “Seeding-dependent propagation versus maturation of amyloid fibril conformation” *J. Mol. Biol.* **352**, 952-960, (2005).
- Kojima, N., Yamanaka, M., Ichiki, S., Sambongi, Y. “Unexpected and elevated production of Aquifex aeolicus cytochrome c_{555} in *Escherichia coli* cells lacking disulfide oxidoreductases” *Biosci. Biotech. Biochem.* **69**, 1418-1421 (2005).
- Komatsuzaki, T., Hoshino, K., Matsunaga, Y., Rylance, G. J., Johnston, R. L., Wales, D. J. ‘How Many Dimension is Required to Approximate Potential Energy Landscape of A Model Protein?’ *Journal of Chemical Physics* **122**, 084714-1~084714-9 (2005).
- Chun Biu Li, Yasuhiro Matsunaga, Mikito Toda, and Tamiki Komatsuzaki ‘Phase Space Reaction Network on a Multisaddle Energy Landscape: HCN isomerization’ *Journal of Chemical Physics* **123**, 184301(1)-184301(13) (2005).
- Chun Biu Li, Akira Shojiguchi, Mikito Toda, and Tamiki Komatsuzaki ‘Dynamical Hierarchy in Transition States of Reactions’ *Few-Body Systems* in press.