

「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

本研究の目的は、蛋白質の折り畳み運動を一分子レベルで観察し、得られた時系列データを解析する手法を開発すること、さらに、蛋白質の水和環境を観察する手法を開発することを通して、蛋白質が折り畳む特性を理解することである。このため、大阪大学(高橋)、広島大学(三本木)、神戸大学(小松崎)、東北大学(鈴木)に研究グループを形成し、個別テーマの研究を進めるとともに、グループ間の議論と共同研究を推進した。

平成 18 年度に実施した研究の概要は以下の通りである。高橋グループでは、蛋白質試料を一分子レベルで観察する手法を改良し、再現性のよいデータの取得を可能にした。三本木グループでは、生育温度の異なる細菌由来のシトクロム *c* の一分子観察や水和環境観察を可能にし、高橋グループと鈴木グループに試料を提供した。また、各シトクロム *c* の物理化学的/生化学的な特性を明らかにした。小松崎グループでは、時系列データから分子の状態空間の動的構造を推定するための解析手法を開発した。鈴木グループでは、蛋白質の水和環境を観察する方法論を開発し、三本木グループで調製したシトクロム *c* の水和状態の観測を行った。

## 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)

本グループでは、蛋白質の折り畳み運動を一分子レベルで観察するための実験的手法を開発することを目標としている。本年度は以下の研究を行った。

- 1) 一分子観測用の鞘流セルの製作:これまで使用したフローセルは、試料の流速が分子ごとに異なり、ぼやけた背景光を拾うなどの欠点を持っていた。これらの欠点を克服するため、観測セルの内側にさらに細いキャピラリーを導入した鞘流セルを製作した。このセルでは、試料を観測セルの中心部に一定速度で流すことができる。本セルを用いると、再現性よく一分子の蛍光信号を得られることがわかった。また、溶液の混合を引き起こした後に、一分子観察を行うことも可能になった。
- 2) 一分子観察用の反射光学系の製作:我々の手法で一分子を観察する場合、従来の顕微レンズは、焦点深度が浅いために背景光を拾いやすい欠点を持っていた。また、拡大倍率が高すぎるた

めに、長時間の観察ができない欠点も持っていた。そこで、光の集光効率は顕微レンズ並みに大きいものの、拡大倍率はカメラレンズと変わらない反射光学系を設計・製作した。この光学系では、光学像の歪みが最小になるよう工夫されており、焦点深度も、カメラレンズ並に深くすることができた。

3) シトクロム *c* の変性状態のダイナミクス観測: シトクロム *c* の変性状態における一分子ダイナミクスの解析を続け、二つの変性状態の中で、片方の状態の運動の相関時間が、他の変性状態に比べて長いことを見出した。得られた成果をまとめた論文を、現在投稿中である。

4) 一本鎖モネリンの折り畳み過程の一分子観測: 一本鎖モネリンに蛍光色素をラベルし、一分子レベルでの蛍光観測を行った。一分子から得られる蛍光データを解析することで、変性状態、あるいは、折り畳み状態にとどまる分子が多くある中で、中間状態と変性状態の間を頻繁に行き来する分子が存在することを見出した。

以上のように、本年度は、一分子の信号検出のための実用的な新手法を開発できた。今後は、蛋白質についてのデータの取得と解析に主力をおいて研究を進める予定である。

## 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)

本グループは、蛋白質の折れ畳み過程の一分子観察と水和状態の解析に用いるシトクロム *c* を調製するとともに、それらの物理化学的/生化学的性質を明らかにすることを目的として研究を実施した。具体的には、表 1 に記載した 5 種類のシトクロム *c* を対象とした。

表 1

シトクロム <i>c</i> 略称	SV	PA	PH	HT	AA
変性温度 (pH5)	90°C	86	108	121	131
一分子観察の準備		Cys 導入	Cys 導入	Cys 導入	
物理化学的/生化学的性質	SS 結合の役割解明	水素結合の役割解明	誘電測定を試料作製		ヘム非依存の構造形成

5 種類のシトクロム *c* の熱に対する安定性を、円二色性分散計、および超高感度示差走査型カロリメータにより測定した。その結果、それぞれの変性温度が大きく異なることが分かった。PA、PH、および HT については、一分子観察のために必要とされる Cys 残基を導入し、高橋グループに提供した。また、誘電測定の対象として PH を大量に精製し、鈴木グループに提供した。

各シトクロム *c* の個別の特性を理解するため、表 1 に記載した物理化学的/生化学的実験を行った。SV の安定性に対する SS 結合の寄与や、AA の生合成過程を解明した。

## 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)

本グループでは、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により長い時系列データを得ることができ

ないため、単純な解析理論では、系の状態空間に関する情報を引き出すことが難しい。更に、蛋白質の時系列データには、時空間スケールが異なる運動が階層的に混在するため、各階層における情報を抽出し、各階層および階層間の状態空間を論じる必要がある。これらの問題意識に基づき、従来の解析手法に改良を加え、フラビン還元酵素の一分子時系列データなどを解析した。

1) 一分子時系列から系の階層的動的構造を再構成する解析手法の開発：ウェーブレット多重時間分解と計算力学に立脚し、局所平衡を予め規定しないで、異なる時空間スケールにおいて、時系列データの因果関係に基づいて状態および状態間遷移ネットワークを構成する方法論を開発した。開発した手法をフラビン還元酵素の一分子時系列データに適用した。短時間領域( $<<0.1$  s)では、ネットワークが多様な準安定状態から構成される動態構造を示すのに対し、長時間領域( $>0.1$  s)では、ネットワークは少数の準安定状態から構成される通常の準安定状態として解釈できることなどを解明した。また、ネットワークの時間変化を可視化する技術を開発した。

2) 時空間スケールの異なる階層的ダイナミクス解析手法の開発：有限サイズリヤブノフ指数と主成分解析を融合した解析手法を開発した。46 ビーズ蛋白質モデルを用いて、変性状態における蛋白質の運動は、探索効率がもつともよいと知られる Levy 飛行的な拡散運動の性質を持つ可能性を明らかにした。また、生体分子近傍の水の異常拡散を評価するための局所拡散解析法と、水の集団運動を評価するサイト速度場ベクトル解析を開発した。

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：1 分子時系列情報から“準安定状態”を構成し、多次元自由エネルギー地形とそれが正当化される時間スケールを構成する方法論を開発した。この方法では、時系列データから観測量に対する局所確率密度関数を評価し、各関数間の計量空間におけるクラスター解析を行い、各クラスターにおける滞在確率および遷移確率から多次元自由エネルギー地形を構成する。46 ビーズの蛋白質モデルの時系列データに適用し、変性状態は、天然状態に比べて“熱化”する時間スケールが長いなどを明らかにした。

4) 階層的エネルギー地形の情報理論と情報理論的ノイズ・フィルタリング手法の開発：蛋白質の折り畳み易さを評価するために、情報エントロピーに基づいてエネルギー地形の構造多型性や経路多重性を定量化する指標を開発した。また、一分子観察により得られる観測時系列からノイズを除去するための手法を、ウェーブレット多重時間分解および情報理論を基に開発した。

#### IV) 一分子観察のための蛋白質水和情報抽出法の開発(鈴木グループ)

1) 蛋白質水和特性解析装置の構築：マイクロ波ネットワークアナライザを導入したコアシステムを構築し、蛋白質水溶液の 0.2GHz~26GHz 誘電スペクトル測定を行えるようになった。

2) シトクロム *c* の誘電スペクトル測定による水和状態解析：ウマ心筋シトクロム *c* 水溶液のマイクロ波 0.2~26 GHz における誘電スペクトルを天然状態および酸変性状態に対して測定した。また、蛋白分子周りに分布する水の誘電特性の情報を抽出するためのフェイスキャン法を考案し、分子のどれだけ外側から水の誘電物性が変化し始めるかを知ることができた。

3)変性温度の異なるシトクロム *c* の水和状態解析：上記方法と手順を用いて、変性温度の異なるシトクロム *c* として、PH の水和状態を 20℃、15℃、10℃において解析した。その結果、高温になるほどハイパーモバイル水が増大し、低温ほど拘束水が増大する結果を得た。また酸化型 PA の場合は、ハイパーモバイル水は検出されず、疎水性水和が多いという結果を得た。

4)水和測定プローブの設計と校正法の開発：マイクロ波ないしミリ波帯（0.2GHz～50GHz）で小容量の蛋白水溶液の誘電スペクトルを測定するため、小容量型プローブを設計し試作した。この電極形状に対する電磁界計算を行い空気と純水に対して計算法のチェックを行っている。

5)蛍光プローブによる溶媒情報抽出の試み：水和情報を確認した水溶液について、リボフラビンやピレンなどの色素の蛍光スペクトルを測定した。リボフラビンでは水の構造破壊作用の強い塩により、強く蛍光が抑制される結果を得た。一方、フェノールやフェノールレッドなどのプロトン解離反応における吸光スペクトル変化から pK 値の変化を測定した。その結果、ハイパーモバイル水の多い水溶液において溶媒の誘電率が低いことが示された。今後より定量的にこの関係を調べ、溶媒情報と相関の高いシグナルを抽出する。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「高橋」グループ(大阪大学)

①研究分担グループ長：高橋 聡 (大阪大学蛋白質研究所 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

#### (2)「三本木」グループ(広島大学)

①研究分担グループ長：三本木 至宏(広島大学大学院生物圏科学研究科 助教授)

#### ②研究項目

・蛍光ラベル蛋白質の調製と物理化学測定

#### (3)「小松崎」グループ(神戸大学)

①研究分担グループ長：小松崎 民樹(神戸大学理学部 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)「鈴木」グループ(東北大学)

①研究分担グループ長：鈴木 誠(東北大学大学院工学研究科 教授)

## ②研究項目

- ・一分子計測のための蛋白水和情報抽出法の開発

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表(原著論文)

- Rylance, G. J., Johnston, R. L., Matsunaga, Y., Li, C. B., Baba, A. & Komatsuzaki, T. “Topographical complexity of multidimensional energy landscapes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18551-18555 (2006).
- Nakamura, S., Ichiki, S., Takashima, H., Uchiyama, S., Hasegawa, J., Kobayashi, Y., Sambongi, Y., Ohkubo, T. “Structure of cytochrome *c*<sub>552</sub> from a moderate thermophilic bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*: Comparative study on the thermostability of cytochrome *c*.” *Biochemistry*, **45**, 6115-6123 (2006).
- Takahashi, Y., Sasaki, H., Takayama, S. J., Mikami, S., Kawano, S., Mita, H., Sambongi, Y., Yamamoto, Y. “Further enhancement of the thermostability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*<sub>552</sub>.” *Biochemistry*, **45**, 11005-11011 (2006).
- Lee, Y. H., Tamura, K., Maeda, M., Hoshino, M., Sakurai, K., Takahashi, S., Ikegami, T., Hase, T., Goto, Y. “Cores and pH-dependent dynamics of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase revealed by H/D exchange.” *J. Biol. Chem.* **282**, 5959-5967 (2007).
- Matsumoto S, Yane A, Nakashima S, Hashida M, Fujita M, Goto Y & Takahashi S. “A Rapid Flow Mixer with 11- $\mu$ s Mixing Time Microfabricated by a Pulsed-Laser Ablation Technique: Observation of a Barrier-Limited Collapse in Cytochrome *c* Folding.” *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3840-3841 (2007).
- Miyake, D., Ichiki, S., Tanabe, M., Oda, T., Kuroda, H., Nishihara, H., and Sambongi, Y. “Thiosulfate oxidation by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*” *Arch. Microbiol.*, *in press*, (2007).