

「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・准教授

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し、得られた時系列データを解析する手法と、蛋白質の水和環境を解析する手法の開発を目的として計画した。このために、四つの研究グループにおける個別テーマの研究と、グループ間の共同研究を推進した。大阪大学におけ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完成させ、さらに改良を進めたほか、蛋白質への応用実験を進めた。広島大学における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* を高橋グループと鈴木グループに提供し、さらに、SV シトクロム *c* の安定化機構の研究と、AA シトクロム *c* の生合成過程の研究を進めた。北海道大学における小松崎グループでは、一分子実験から得られる時系列データを用いて、分子の状態空間におけるさまざまな動的構造を推定する手法を開発した。東北大学における鈴木グループでは、蛋白質の水和環境を観察するための誘電スペクトル測定装置の開発を進め、変性温度の異なるシトクロム *c* の水和状態の観測を行った。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

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) 一分子観察法によるシトクロム *c* の運動の観察 : シトクロム *c* が折り畳み転移する様子の一分子観察を行った。得られた一分子の蛍光強度の頻度分布には、中間状態と変性状態に対応する二つのピークが見られた。さらに、時系列データの自己相関関数を計算したところ、中間状態

はミリ秒以内に減衰を示した一方で、変性状態の減衰は15ミリ秒程度だった。この結果は、変性蛋白質の運動が従来考えられていたよりも遅いことを示唆した（論文 I-1）。

2) 鞘流セルを使った一分子観察法の開発：さらなる装置開発として、二重のキャピラリーを持つ「鞘流セル」を制作した。このセルを使うことで、蛋白質試料の位置を流路の中心部のみに制限することが可能になり、バックグラウンドを減らし、データのS/N比の向上と試料の吸着を減らした再現性のよい観測が可能になった。さらに、溶液混合を用いた非平衡状態での観測が可能となった。このセルを用いることで、変性状態からpHジャンプを起こした後のシトクロムcの運動について観測を行った。

3) 新規反射光学系の開発：第二の装置開発として、広い視野と高い集光効率を両立した新規集光系を製作した。市販の顕微レンズは高い集光効率を持つものの、拡大倍率が高いために、一分子を継続して観測することが難しい。そのため、拡大倍率は小さいものの高い集光効率をもつ反射光学系を製作した。この集光系を使うことで、顕微レンズに近い効率による蛍光観察が可能になったが、まだ、像のゆがみ等の問題が残っているため、収差を取り除く工夫を行っている。

4) 一本鎖モネリンと細菌由来シトクロムcの一分子観察：一本鎖モネリンと細菌由来のシトクロムcについて、一分子観察を進めた。両蛋白質について、蛍光観察のためのラベル化を行った。ラベル化した細菌由来のシトクロムcについて、安定性の確認を行った。ラベル化した一本鎖モネリンについて、一分子観察を行ったところ、運動特性の異なるいくつかの状態の存在が示唆された。

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いる。本年度は、表1に挙げる5種類のシトクロムcを対象に、以下の研究成果を得た。

表 1

シトクロムc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	イオン結合 硫黄代謝		ヘム非依存の構造形成

1) SVの安定性と酸化還元電位調節：SVは分子内にジスルフィド(SS)結合を持つシトクロムcである。SS結合を欠損する変異体の安定性は低下するものの、酸化還元電位は変化しないことを明らかにした（論文 II-1）。SVと同様に、分子内にSS結合を持つシトクロムcを新たに探索し、SVと併せてSS結合が蛋白質の安定性と酸化還元電にどのように影響するのかを調べた。

2) PA、PH、HTの量産：高橋グループが実施するシトクロムc折れ畳み一分子観測のため

に、三者を 100mg 程度精製し、高橋グループに提供した。並行して、PA 分子内の水素結合、および PH 分子内のイオン結合の安定性への影響を調べた。さらに、生化学のレベルから、PH を生産する中程度好熱性細菌の硫黄代謝機構について調べた（論文 II-2）。

3) AA のアポ体の構造とヘムの取り込み：AA のアポ体はホロ体と同様の二次構造を形成することができ、ヘムを自発的に分子内に取り込むことを明らかにした。さらに、AA のホロ体の三次構造を X 線結晶構造解析により決定し、AA アポ体の構造形成能とホロ体の超耐熱性の要因を蛋白質構造から推定することができた。

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)

実際の一分子観察においては、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困難であり、また、蛋白質の運動は階層的な時空間スケールが混在している。そのため、比較的、短い時系列データの集まりに対しても、解析可能であり、かつ、時空間スケールの関数として、変化する階層性のエネルギー地形、階層的状態空間を評価できる方法を確立する必要がある。平成 19 年度は従来の解析手法に改良を加え、異なる階層のあいだの情報流の評価する手法などを新たに開発した。

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：第三年次に引き続き、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、状態および状態間遷移ネットワークを構成する「第一原理的」時系列解析理論を確立することを目的として、以下のことを行った。①蛍光寿命揺らぎにおいて異常拡散が観測されているフラビン還元酵素の一分子時系列データ（Yang ら *Science* **302**, 262 (2003)）に対し、時間スケールと共に変化する状態遷移トポロジーを再構成し、ネットワーク上のマルコフキネティクスから蛍光寿命揺らぎの自己相関関数を解析的に導出することに成功した。約 0.1s 以下の時間スケールにおいてブラウン運動を仮定した理論値は実験結果を再現しないが、(1 分子時系列から導出した) 状態遷移ネットワークに基づく理論値は時間スケールに応じて変化する拡散現象の多様性を理論的に評価することができた（論文 III-1）。②複雑に張り巡らされた状態ネットワークの次数（=ノード（状態）あたりのリンク数）や状態遷移の多様性が時間スケールとともに、どのように変化するかを調べた。ブラウン拡散の時間領域に近づくにつれて、ネットワークがコンパクトになり、ノード（状態）ひとつ当たりのリンク数が増大し、状態遷移ネットワークのもつ多様性が減少することが明らかとなった（論文 III-1）。③社会学、生態学、WWW、代謝ネットワークなどにおいて重要な概念である“スケールフリー”（Barabasi ら *Science* **286**, 509 (1999)）の存在をフラビン還元酵素の構造揺らぎの状態遷移ネットワークに対して調べ、ブラウン運動で表すことが困難な異常拡散を示す時間領域のネットワークではスケールフリー性を有しているが、通常のブラウン運動として表現される 480ms 以上の時間領域の時間成分から構成されたネットワークはスケールフリー性を有していないことなどが初めて実験値に基づいて示された。

2) 時空間スケールの異なる階層的ダイナミクスの解析手法の開発: ウェーブレット多重解像度解析と計算力学を融合し、時間スケールの異なる複数の時系列情報のあいだの情報伝達、情報伝達の方向性、強さを移動エントロピー (Schreiber, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 461 (2000)) を用いて定量化する方法論を考案した。複数の時定数が混在した生体分子ダイナミクスの各階層における軌道の性質を定量化する方法論を開発した(論文 III-3、III-4)。

3) エルゴード測度解析と自由エネルギー地形を推定する時系列解析手法の開発: 各準安定状態における局所平衡が達成される時間スケール、準安定状態から別の準安定状態に遷移していく時間スケールの両者を 1 分子時系列情報から同定し、多次元自由エネルギー地形が正当化される時間スケールを考察しつつ、構成・可視化する方法論を開発した(論文 III-2)。高橋グループにより観測された一本鎖モネリンの一分子時系列情報に適用するために、ベースライン補正、蛍光強度の不均一性などの解析の前処理手法を考案した。

4) 情報理論的ノイズ・フィルタリング手法の開発: 時系列をシンボル化する際に損失する情報を最小にするためにはどのような手続きが最適であるかは未解決な難問である。ある 2 自由度力学系を例に取り上げて、得られるネットワークがもつ多様性 (すべての状態の滞在確率に対するシャノン情報量) を最大にするように座標の時系列データをシンボル化すると、時系列情報の背後に存在する相空間構造の非一様性を反映したネットワーク構造が再構成できることを見出した。

IV) 一分子観察のための蛋白分子の水和情報の抽出法の開発(鈴木グループ)

鈴木グループの研究目的は、蛋白質周囲の水の情報を検出することである。蛋白質のダイナミクスと機能がより正確に理解できると考えられたためである。この目的のために、本年度は以下の研究を実施し、生体分子の誘電スペクトルを観察する装置とデータの解析理論を完成させた。さらに、シトクロム *c* 試料の作製方法を確立した。

1) 蛋白質の誘電スペクトル観察装置の開発: 所定の目標である 0.2GHz~26GHz 誘電スペクトル測定システム、および 1GHz~50GHz 誘電スペクトル測定システムを構築した。プローブ固有の共振ノイズを補正するためにこの 2 重のシステムはきわめて有効であり、測定周波数領域で比誘電率の誤差を 0.02 以下におさえる目途が得られた。また、Hanai や Asami の混合理論を応用し、蛋白質の周囲に分布する水の誘電特性を抽出するためのフェイスキャン法を考案した。これにより、溶質分子のどれだけ外側から水の誘電物性が変化するかを知ることができるようになり、粒状あるいは線状の溶質についてバルクと水和層の境界のサイズを決めることが可能になった。

2) 変性温度の異なるシトクロム *c* の大量発現と精製システムの開発: 三本木グループから変性温度の異なるシトクロム *c* の作製法を習得し、鈴木グループにおいて作製システムを構築した。これまでに PA の作製が可能となった。

3) PA シトクロム *c* の誘電スペクトル測定と解析: PA シトクロム *c* についても誘電スペクトル測定を行い、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) 誘電スペクトル観察のための小型セルの開発：従来より容量で約 50 分の 1 の 0.07mL の試料溶液について、50GHz まで測定が可能な円筒状薄型小型セルについて電磁場解析を行い、複素反射係数の理論値と実測値の比較を行いさらなる電磁場特性と校正法の改善を進めている。

5) 水の構造変化を検出するための色素の探索：新たに注目したのは、フェノールなどの弱酸が pH を高めると酸解離する反応である。フェノール水溶液の誘電スペクトル測定とあわせて解離反応の pK シフトから水の構造変化を光検出できる可能性を示すものである。

3. 研究実施体制

(1) 高橋グループ

① 研究分担グループ長：高橋 聡（大阪大学、准教授）

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

① 研究分担グループ長：三本木 至宏（広島大学大学院、准教授）

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

① 研究分担グループ長：小松崎 民樹（北海道大学、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

① 研究分担グループ長：鈴木 誠（東北大学大学院、教授）

② 研究項目

・高分解誘電スペクトル測定装置の高周波数(50GHz)への延長

・小容量プローブの開発

・熱変性温度の異なるシトクロムcの作成と誘電緩和分光解析

・水構造情報の光検出法の探索

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- I-1. Kinoshita, M., Kamagata, K., Maeda, A., Goto, Y., Komatsuzaki, T. and Takahashi, S. Development of a New Technique for the Investigation of Folding Dynamics of Single Proteins for Extended Time Periods. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10453-10458.
- I-2. Matsumoto, S., Yane, A., Nakashima, S., Hashida, M., Fujita, M., Goto, Y. and Takahashi, S. A Rapid Flow Mixer with 11-us Mixing Time Microfabricated by a Pulsed-laser Ablation Technique: Observation of a Barrier-limited Collapse in Cytochrome c Folding. (2007) *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 3840-3841.
- I-3. Nishiguchi, S., Goto, Y. and Takahashi, S.: Solvation and Desolvation Dynamics in Apomyoglobin Folding Monitored by Time-Resolved Infrared Spectroscopy. (2007) *J. Mol. Biol.* (2007) **373**, 491-502.
- II-1. Ogawa, K., Sonoyama, T., Takeda, T., Ichiki, S., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Uchiyama, S., Nakasone, K., Takayama, S.J., Mita, H., Yamamoto, Y., Sambongi, Y. Roles of a short connecting disulfide bond in the stability and function of psychrophilic *Shewanella violacea* cytochrome c5. *Extremophiles*, **11**, 797-807 (2007)
- II-2. Miyake, D., Ichiki, S., Tanabe, M., Oda, T., Kuroda, H., Nishihara, H., Sambongi, Y. Thiosulfate oxidation by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*. *Arch. Microbiol.*, **188**, 199-204 (2007).
- III-1. Chun Biu Li, Haw Yang, and Tamiki Komatsuzaki 'Multiscale Complex Network of Protein Conformational Fluctuation Buried in Single Molecule Time Series' *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, **105**, 536-541 (2008).
- III-2. Akinori Baba and Tamiki Komatsuzaki 'Construction of effective free energy landscape from single molecule time series' *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **104**(49),19297-19302 (2007)
- III-3. Yasuhiro Matsunaga, Chun Biu Li, and Tamiki Komatsuzaki 'Anomalous Diffusion in Folding Dynamics on Minimalist Protein Landscape' *Physical Review Letters* **99**, 238103 (4pages) (2007).
- III-4. 松永康佑・小松崎民樹「高分子とカオスー異常拡散と階層的規則性ー」*日本高分子学会誌 高分子* **57**(2),58-61 (2008)