

「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、蛋白質が一分子レベルで折り畳まる運動を連続的に観察する実験手法と、この実験により得られた時系列データを解析する理論を開発すること、さらに、蛋白質の水和環境を含めて蛋白質が折り畳む特性を理解することを目的としている。H20 年度は、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、データ取得の労力を低減した。さらに、数種類の蛋白質の一分子観察を行い、変性状態に共通して遅い運動が存在することを明らかにした。三本木グループでは、安定性の異なるシトクロム *c* を高橋・鈴木グループに提供すると共に、個別のシトクロム *c* の物性を明らかにした。特に、特異な折り畳み特性を持つ AA シトクロム *c* の構造を解明した。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解析理論を深化させ、手法を多くの実験データに適応する研究を進めた。鈴木グループでは、独自に開発した誘電緩和測定法により、PA シトクロム *c* の水和状態の解析を行った。以上のように、これまでの努力により、本 CREST 研究の主目的である一分子観察装置や誘電緩和スペクトルの観測装置の開発がほぼ終了し、データ解析理論の枠組みも完成した。残された研究期間は、開発した装置や解析手法を使って多くの結果を得ることで、生物学的あるいは物理化学的にインパクトのある成果を挙げることに全力を尽す予定である。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

(1) 高橋グループ

高橋グループでは、一分子観察装置を改良し、新たな蛋白質試料の一分子観察実験を進めた。具体的には、以下の進展が得られた。

- ①一分子観察装置の改良を進め、S/N 良くかつ労力が少なく一分子観察を行うための装置改善を進めた。拡大倍率が小さく開口角が大きい独自の集光鏡を利用することで、試料を流すキャピラリーの内径を小さくすることを可能にした。内径の小さなキャピラリーは、比較的高い試料濃度でも一分子観察が可能であるために、試料の吸着に起因する実験の労力を軽減すること

ができる。一日の実験で 100 トレース以上の一分子データを容易に得ることが可能になった。このほか、ラインフォーカス型の共焦点集光システムを製作し、性能を評価している。

②装置を使って得られる連続画像データから、一分子が発する時系列データを抽出するアルゴリズムを、小松崎グループと共同して製作した。新しいアルゴリズムは、データ処理が高速であり、解析者の恣意性を減らすことを可能にした。

③三本木グループにより供給された三種類のシトクロム *c* と一本鎖モネリンなどの新しい蛋白質について、一分子観測実験を進めた。これまで計測した全ての蛋白質について、変性状態において数十ミリ秒の時定数を持つゆっくりした運動が観察された。

④一分子時系列データから蛋白質の平衡化時間を求める手法と、さや流セルを使った溶液混合後の一分子測定について、論文化の努力を進めている。また、時分割赤外分光法と高速パルスラベル法を用いた折り畳み過程の観測結果を論文化した[1,2]。

(2) 三本木グループ

三本木グループは、一分子観察に適した蛍光ラベル化蛋白質の作製、および作製した蛋白質の構造・安定性の評価を担当している。昨年度までに、研究に用いる7種類のシトクロム *c* の大腸菌での発現系を構築し、安定性を測定した。今年度の進捗状況は、以下の通りである。

①もともと熱安定性が高い超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来のシトクロム *c* (AA と略記) の立体構造を X 線結晶解析により決定した(論文投稿中)。通常のシトクロム *c* に比べてヘリックス構造に富むことが分かった。

②上記 AA は、通常のシトクロム *c* と異なり、ヘムが結合していなくてもホロ型と同様な折り畳み構造を持つことを実証した(論文投稿中)。この結果は、電子伝達系で機能するヘム蛋白質では観察されず、ヘム蛋白質の折り畳み過程におけるヘム結合の役割について新しい知見を加えるものである。

③7 種のうち中程度の熱安定性を持つシトクロム *c* (PH) ともともと安定性が低い PA に変異を導入し、それぞれの安定性に関わるアミノ酸残基を同定した[3,4]。約 80 残基中、安定性に関わる残基は 5 残基程度であったことから、蛋白質の安定性は、少数のアミノ酸で制御できることを示した。なお、PH は今年度新たに一分子観察のためのラベル化実験に供した。

(3) 小松崎グループ

前年度に準安定状態の局所平衡が達成される時間スケールや、準安定状態間を遷移する時間スケールを 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を構成する方法論 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**,19297 (2007))、ならびに、局所平衡を規定せずに、異なる時空間スケールの反応ネットワーク構造を構成する時系列解析理論 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 536 (2008) など) を確立した。今年度は、前者においては、汎用性を高めるためのアルゴリズムの自動化を行い、方法論の詳細に立ち入らずに幅広く利用して貰うための汎用化を行った。また自由エネルギー地形の次元性を評価する簡便な方法を考察した(論文執筆中)。後者においては、各時間スケールにおける統計性やネットワークのスケール性と蛋白質機能の関係、情報伝達のカスケード性の定量化、時系列をシンボル化する際に損失する情報量を最小にする基礎理論の開発などを行った(論文執筆中)。

その他、高橋グループにより観測される蛍光強度の経時変化から必要となる1分子時系列データを抽出するための前処理手法を考案した。また、我々が開発した手法を機械受容チャンネル MscL のパッチクランプ法による電流時系列に適用し、膜に与える張力の大きさに依存して、キネテックスが多様な変化(指数緩和からべき緩和へ)を示すこと、ならびにそれらの背後に存在する状態に依存して滞在時間分布が多様に変化する状態遷移ネットワークを明らかにした(論文執筆予定)。更に、一分子計測時系列情報に依拠する階層的ダイナミックスの解析手法の深化と展開、量子ドットの一分子時系列解析によるブリンキング現象の状態ネットワーク解析なども推進し、多角的に解析手法の深化を行った。

(4) 鈴木グループ

鈴木グループは、一分子観察のための蛋白質和情報抽出法の開発を担当している。昨年度までに、0.2 GHz~26 GHz 測定と 1 GHz~50 GHz 測定システムを併用したプローブ固有の共振ノイズの除去法を確立し、蛋白分子周りに分布する水の誘電物性がバルクのそれと異なる領域を決定する方法を提案した。今年度の進捗状況は、以下の通りである。

①水和情報抽出法の開発 マイクロ波誘電緩和分光法に昨年度提案した方法を組み合わせ、モデル粒子(アルカリ、ハライドイオン)を用いて粒子表面の水の誘電緩和特性とその領域の大きさを決定する方法を開発した。この成果は JPC-A に掲載された[6]。

②開発した方法をシクロム c(PA)測定に応用して pH=6 から pH=1 までの酸変性過程に対応する水和状態の変化を定量的に評価した。その結果、PA では、6 GHz の緩和周波数をもつ拘束水が、N 状態に比較して3倍に増加することを明らかにした。また、吸光度上は N と D の中間にある pH=1.78 において、拘束水の量はほぼ D 状態の量に近い値であった。このことは、ヘムの吸収 621nm の情報と、誘電分光でみる水和情報では変性の中間点が異なる情報を与えることを示し、水との接触面積がその pH でほぼ飽和することを示唆した。

このほか、小容量のプローブの校正法を開発するため、基準物質として誘電緩和特性の単純なグリニンを使用する方法などの検討を進めている。

3. 研究実施体制

(1) 高橋グループ(大阪大学)

①研究担当グループ長: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(広島大学)

①研究担当グループ長: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(北海道大学電子科学研究所電子計測制御部門)

①研究担当グループ長：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（東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻）

①研究担当グループ長：鈴木誠（東北大学大学院、教授）

②研究項目

一分子観察のための蛋白質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）

1. Kimura, T., Maeda, A., Nishiguchi, S., Ishimori, K., Morishima, I., Konno, T., Goto, Y., Takahashi, S. “Dehydration of mainchain amides in the final folding step of single chain monellin revealed by time-resolved infrared spectroscopy” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 13391-13396 (2008).
2. Uzawa, T., Nishimura, C., Akiyama, S., Ishimori, K., Takahashi, S., Dyson, H. J., Wright, P. E. “Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 13859-13864 (2008).
3. Hakamada, S., Sonoyama, T., Ichiki, S., Nakamura, S., Uchiyama, S., Kobayashi, Y., Sambongi, Y. “Stabilization mechanism of cytochrome *c*₅₅₂ from a moderately thermophilic bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 72, 2103-2109 (2008).
4. Sonoyama, T., Hasegawa, J., Uchiyama, S., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Sambongi, Y. “Stability enhancement of cytochrome *c* through heme deprotonation and mutations” *Biophys. Chem.*, 139, 37-41 (2009).
5. Takeda, T., Sonoyama, T., Takayama, S. J., Mita, H., Yamamoto, Y., Sambongi, Y. “Correlation between stability and redox potential of three homologous cytochromes *c* from two thermophiles and one mesophile.” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 366-371 (2009).
6. Miyazaki, T., Mogami, G., Wazawa, T., Kodama, T., Suzuki, M. “Measurement of the Dielectric Relaxation Property of Water-Ion Loose Complex in Aqueous Solutions of Salt at Low Concentrations”, *J. Phys. Chem. A*, 112, 10801-10806 (2008).
7. Kinoshita, M., Suzuki, M. “A statistical mechanical analysis on the hypermobile water around a large solute with high surface charge density” *J. Chem. Phys.*, 130, 014707(1-11) (2009).
8. Kobayashi, Y., Sonoyama, T., Takeda, T., Sambongi, Y. “Effects of cysteine introduction into three homologous cytochromes *c*” *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 1227-1229 (2009).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)