

## 蛋白質のフォールディング自由エネルギー地形と中間体アンサンブルの探索

### Exploring free energy landscapes and intermediate ensembles of protein folding

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者 名古屋大学 榎 互介 Nagoya University Kosuke Maki

Folding of a model protein, staphylococcal nuclease (SNase) was investigated by using the continuous- and stopped-flow fluorescence methods in combination with the single-Trp mutation. SNase folds into the native state via parallel folding pathways with accumulation of several folding intermediates. The first intermediate accumulates within 100  $\mu$ s after the initiation of the refolding reaction, whose formation cannot be monitored by conventional stopped-flow instrumentations due to too long a deadtime ( $\sim$ ms). In addition, structural formation of this intermediate occurs primarily in one of the two domains (the  $\beta$ -barrel domain). The naturally occurring sole Trp140, located close to the C-terminus, are little sensitive to the  $\beta$ -barrel formation. These difficulties were partly overcome by developing the continuous-flow instrumentation whose deadtimes is approximately 120  $\mu$ s. The continuous- and stopped-flow instrumentations covered the time region ranging from 120  $\mu$ s to  $\sim$ 100 s, enabled us to monitor the early folding events. Two single-Trp variants, W140H/F34W (Trp34) and W140H/V66W (Trp66) SNase, were constructed, which have the sole Trp residue within the  $\beta$ -barrel domain. They accumulated at least one equilibrium intermediate under mildly denaturing conditions. The kinetic experiments suggested that the equilibrium intermediate is corresponding to the folding intermediates accumulated in the early stages of the folding.

### 研究目的

蛋白質のフォールディングとは、ほどけたポリペプチド鎖が生物学的機能を持つ天然立体構造へと至る過程のことである。蛋白質のフォールディングは、遺伝暗号発現の最終段階であるだけでなく、蛋白質複合体、細胞内器官などのより高次の構造形成の素過程に対応する。従って、蛋白質のフォールディングは、生物科学において本質的に重要な現象である。また、蛋白質のフォールディングは、熱・統計力学に支配された現象でもあるので、物質科学としての側面も持つ。生命現象を、物理化学や分子科学として理解するためには、生物科学と物質科学との境界に位置する蛋白質のフォールディングの物理化学を解明することが必要不可欠である。

多くの蛋白質は、フォールディング過程において中間体を蓄積する。これら中間体の蓄積は、ポリペプチド鎖が効率的に天然立体構造へ至るために本質的であると考えられてきた。一方で、最近の理論的研究によると、蛋白質のフォールディングは、漏斗型のエネルギー地形によって記述され、さらに中間体の蓄積はフォールディングに

本質的ではないという結果が得られている。本研究の目標は、モデル蛋白質としてスタフィロコッカール・ヌクレアーゼ(SNase)を用いて、蛋白質のフォールディング・エネルギー地形を実験の立場から定量的に記述し、蛋白質フォールディングの物理化学的機構、フォールディング中間体の役割を明らかにすることである。

## 研究経過

本研究の目標を達成するためには、SNaseのフォールディング反応を構造・エネルギーの両面から詳細に検討することが必要不可欠である。このためには、フォールディング初期から天然状態まで、できるだけ詳細に構造形成過程を観測することが必要である。フォールディング反応初期から構造変化を観測することを可能にするために、従来用いられてきた速度論的手法であるストップ・フロー法に比べておよそ二桁不感時間が短い連続フロー法を用いる。また、アミノ酸残基レベルでの分解能で構造形成を観測するために単トリプトファン(single-Trp)変異法を用いる。これまでは、1. 連続フロー装置の開発および2. single-Trp 変異体の作成と特徴付けに主眼を置いて研究を進めてきた。これまでの具体的な成果を以下に述べる。

### 1. 連続フロー装置の開発

連続フロー装置の概念図を Fig. 1 に示す。装置は、溶液混合器と反応検出部とからなる。シリンジから導入された二種類の溶液を混合器において高速混合することによって迅速に反応を開始する。反応過程を観測している間、溶液を定流速で連続的に流すことによって、混合器直後からの距離が反応時間に対応することになる。溶液が流れている間 CCD カメラを用いて光学セルをイメージングすることによって、反応に伴う蛍光強度変化を観測する。フォールディング反応の場合には、シリンジのひとつから変性蛋白質溶液を、もう一つからリフォールディング緩衝溶液を導入し、これらの溶液を混合することによって天然条件を実現し、反応を開始する。装置の溶液混合能率と不感時間を測定することにより、作成した装置の性能を評価した。N-アセチル-L-トリプトファンアミド(NATA)溶液の希釈による蛍光強度の時間変化によって装置の混合能率を評価し、N-ブロモコハク酸イミドによる NATA の蛍光消光過程によって装置の不感時間を評価した。装置の不感時間は約 120 マイクロ秒であった。

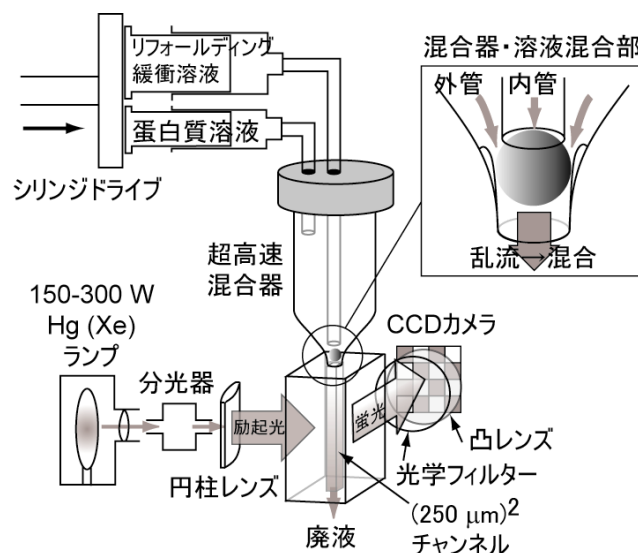


Fig. 1 Schematic representation of a continuous-flow instrumentation.

連続フロー装置が観測できる時間領域は、反応開始後 120 マイクロ秒からたかだか 800 マイクロ秒であった。ストップ・フロー装置の不感時間がおよそ 5 ミリ秒であるので、測定に際してたとえ連続フロー法とストップ・フロー法とを組み合わせる用いたとしても、反応開始後 800 マイクロ秒から 5 ミリ秒までの間の反応を観測することができない。この困難を克服するために、これまでの装置に加えてフローセルのチャンネルの大きさを  $0.25 \times 0.25$  ミリメートル平方から  $0.5 \times 0.5$  ミリメートル平方に変更したものを作成した。この改造により、連続フロー装置は、750 マイクロ秒から約 3 ミリ秒の時間領域を観測できるようになった。従来から用いていた装置と組み合わせることによって、反応開始後 120 マイクロ秒から約 3 ミリ秒、約 5 ミリ秒以降を観測できるようになった。

## 2. 新たな single-Trp 変異体の作成とそのフォールディング

これまでの研究から、野生型および W140H/F76W (Trp76) single-Trp 変異体 SNase のフォールディングについては、反応開始後約 80 マイクロ秒の反応初期から天然状態に至るまである程度明らかになっている。速度論的研究によると、反応初期に $\beta$ ドメインにおいて顕著な構造形成が確認されている。しかし、Phe76 は、 $\beta$ ドメインの端に位置しているので、必ずしも $\beta$ ドメインの構造形成を観測するために最適である訳ではない。 $\beta$ ドメイン内での構造形成の詳細をより明らかにするために、新たな single-Trp 変異体である W140H/F34W (Trp34)および W140H/V66W (Trp66) SNase を作成した。

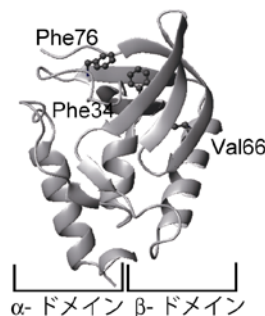


Fig. 2 Ribbon diagram of P47G/P117G/H124L SNase based on an x-ray crystallographic structure. In the single-Trp variants, Trp34, Trp66 and Trp76 SNase, Phe34, Val66 and Phe76 were replaced by Trp, respectively, whereas Trp140 was replaced by His.

これらの変異体について、Trp の蛍光をプローブとして尿素による平衡論的アンフォールディングを調べた。Trp76 SNase と同様に、穏和な変性条件下において平衡論的中间体を蓄積した。アンフォールディング転移曲線を解析することにより、この中間

体の蛍光スペクトルを再現した結果、蛍光強度および蛍光極大波長( $\lambda_{\max}$ )は、天然状態とアンフォールド状態の間にあった。特に中間体の $\lambda_{\max}$ は天然状態の $\lambda_{\max}$ に近く、新たに導入された Trp 残基の側鎖は、中間体において分子内に部分的に埋もれていることが示唆された。連続フロー法およびストップ・フロー法を用いたリフォールディング/アンフォールディングの速度論的測定から、これら平衡論的中间体は、フォールディング中间体であることが示唆された。

## 考察

これまで平衡論的アンフォールディングを調べた三種類の single-Trp 変異体 Trp34、Trp66、Trp76 SNase は、いずれも穏和な変性条件下で平衡論的中间体を蓄積し、さらにその中间体はフォールディング反応過程において蓄積する中间体であることが示唆された。これらの変異体の Trp 残基は、いずれもフォールディング初期に構造形成する $\beta$ ドメインにあるので、SNase のフォールディング反応初期過程の詳細を明らかにするためのよいプローブとなる。さらに、これらの変異体が蓄積する平衡論的中间体は、安定性、構造について速度論的中间体よりも詳細に調べることができるので、蛍光共鳴エネルギー移動を利用して SNase のフォールディング自由エネルギー地形を評価するためのよい手がかりとなる。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 榎 互介「蛋白質フォールディングの実験的研究」(名古屋大学生誕 50 周年記念行事、2009 年 3 月 25 日(予定)、愛知県名古屋市)
2. 榎 互介「スタフィロコッカル・ヌクレアーゼのフォールディング機構」(最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発利用プロジェクト・次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェア研究開発拠点：連続研究会「タンパク質機能(フォールディング)」、2009 年 3 月 30 日(予定)、東京都文京区)
3. 春日康子、榎 互介「スタフィロコッカル・ヌクレアーゼの単一トリプトファン変異体(Trp66)のフォールディング」(第 9 回日本蛋白質科学会、2009 年 5 月発表(予定)、熊本県熊本市)
4. 鈴木精一、榎 互介「 $\beta$ バレル内にトリプトファンを導入したスタフィロコッカル・ヌクレアーゼ変異体のフォールディング」(第 9 回日本蛋白質科学会、2009 年 5 月発表(予定)、熊本県熊本市)