

## 蛋白質フォールディングの物理化学的解析

●桑島 邦博

東京大学大学院理学系研究科

### 〈研究の目的と進め方〉

ゲノム科学の躍進によりもたらされた膨大なゲノム情報を真に有効に活用するためには、蛋白質の基礎的研究、とりわけ球状蛋白質フォールディングの分子機構に関する物理化学的研究が重要である。Anfinsenらの先駆的研究によりフォールディングは熱統計力学に基づく物理化学的過程であることが確立されている。フォールディングはゲノム情報に含まれる個々の遺伝子配列から機能を持った蛋白質構造が構築される過程であり、この蛋白質構築の原理的理解は、ゲノム情報から構造情報を導き出し、さらに機能を同定する上での究極的解決をもたらすはずである。したがって、物理化学の原理から演繹的に立体構造と機能を導くことを目標とする、蛋白質フォールディング機構の研究は、本来、蛋白質一次配列や立体構造の経験的データベースに基づく帰納的なアプローチとは相補的な関係にあり、ゲノム情報科学における根元的な課題として重要視されなければならない。本研究は、このような立場から、球状蛋白質フォールディングの統一的描像を実験と計算機シミュレーションを用いて確立することを目的とする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

本研究は平成14-15年度の二年間を計画している。 $\alpha$ -ラクタアルブミン、イヌ・ミルク・リゾチーム、スタフィロコッカス・ヌクレアーゼなどモルテン・グロビュール中間体の性質のよく知られた蛋白質をフォールディング反応解析の試料として用いる。以下の三つのアプローチを用いる。(1) 中間体の安定性の異なるさまざまな変異蛋白質を作成し、ストップフロー-CDスペクトル、ストップフロー-X線溶液散乱などを用いて、中間体の安定性と巻き戻りの速度論的解析を行う。(2) 高圧力下での温度ジャンプ蛍光スペクトル法によるモルテン・グロビュール状態形成過程の速度過程を直接観測し速度論的に解析する。(3) 高温での蛋白質アンフォールディングの分子動力学シミュレーションを行い、上記実験結果と比較する。これらの結果をまとめ階層的フォールディングモデルの是非を明らかにする。

### 〈研究期間の成果〉

(1) プロリンを含まないスタフィロコッカス・ヌクレアーゼ (SNase) の巻き戻り反応をストップフロー-pHジャンプ法により解析した。その結果、巻き戻り反応が複数の指数項で表される多相的な反応であることがわかった。一般に巻き戻りの多相性は変性状態におけるプロリン・ペプチド結合の遅い異性化反応に帰せられるが、上記の結果は、プロリン異性化以外にも多相性をもたらす要因があることを示している。ストップフロー・ダブルジャンプの結果より、多相性の原因は、(i) SNaseの巻き戻り初期に複数の過渡的中间体が蓄積する、(ii) 各中间体を通して複数の巻き戻り経路が存在する、の二点であることがわかった (3, 17)。今回の結果は、単一のポリペプ

チド鎖が複数のフォールディング経路を通して天然状態に至ることを明確に示した最初の例であり、今後、巻き戻りにおける複数経路の役割をさらに調べることが必要である。

- (2) ヤギ  $\alpha$  LAの大腸菌による組換え体 (N末メチオニンあり) と真性体 (メチオニンなし) の二種の蛋白質を対象に、分子動力学によるアンフォールディングシミュレーションを行なった。その結果、組換え体に付加しているN末端のメチオニン残基により、常温においてもN末端近傍の揺らぎが著しく大きくなることがわかった (2, 10)。今後、NMR等の実験等によりこれを確かめる必要がある。
- (3) 上記のSNaseおよび緑色蛍光蛋白質などのわれわれのデータも含め、中間体を含む非二状態蛋白質のフォールディング速度に関する実験データを文献から収集して、フォールディング速度と天然立体構造パラメータとの間の相関に関する統計解析を行った。その結果、中間体形成速度、天然状態形成速度のいずれも天然主鎖構造のトポロジーを表すパラメータと強く相関した。中間体は一般にフォールディングの生産的な中间体であること、非二状態蛋白質と二状態蛋白質の双方を含めたフォールディングの統一的描像を得ることが可能であることがわかった (1, 9)。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

上記(1)の成果は蛋白質フォールディングの複数経路の存在を明確に示した例として高く評価されており、2003年10月に公表された論文17は既に8回引用されている。(2)の成果は、同一の研究者が実験とシミュレーションの両者を用いて双方向的なアプローチを行い、蛋白質の安定性と運動性に関わる現象を原子レベルで解き明かすことに成功した例として評価されている。2004年8月に公表された論文10は現在4回の引用である。上記(3)は蛋白質フォールディングの分子機構に関する統一的理解をもたらす成果として高く評価されており、2004年6月に公表された論文9は既に19回引用されている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

研究期間が1年間であったため、かなりやり残したことがある。上記の(2)に関しては、計算機シミュレーションが実験をよく再現することが明らかとなり、最近になってようやく論文とすることができた (論文2)。また、NMR等の実験は現在進行中である。

### 〈今後の課題〉

蛋白質フォールディング機構の物理化学的理解のためには、実験的研究と分子シミュレーションによる研究との間の組み合わせが今後ともより一層必要とされる。このような成果をたくさん蓄積することにより、最終的にはゲノム配列のみから物理化学の原理に基づいて蛋白質の構造と機能を予測することが可能となる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Kamagata, K. and Kuwajima, K. Surprisingly high correlation between early and late stages in non-two-state protein folding. *J. Mol. Biol.* in press. (2006)
2. Oroguchi, T.; Ikeguchi, M.; Saeki, K.; Kamagata, K.; Sawano, Y.; Tanokura, M.; Kidera, A. and Kuwajima, K. Atomically detailed description of the unfolding of  $\alpha$ -lactalbumin by the combined use of experiments and simulations. *J. Mol. Biol.* 354, 164-172 (2005)
3. Maki, K.; Kamagata, K. and Kuwajima, K. Equilibrium and kinetically observed molten globule states. *Protein Folding Handbook*. Buchner, J. and Kiefhaber, T. 2, pp 856-883. (2005) Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
4. Nakao, M.; Maki, K.; Arai, M.; Koshiha, T.; Nitta, K. and Kuwajima, K. Characterization of Kinetic Folding Intermediates of Recombinant Canine Milk Lysozyme by Stopped-Flow Circular Dichroism. *Biochemistry* 44, 6685-6692 (2005)
5. Akhtar, M.W.; Srinivas, V.; Raman, B.; Ramakrishna, T.; Inobe, T.; Maki, K.; Arai, M.; Kuwajima, K. and Rao, C. Oligomeric Hsp33 with enhanced chaperone activity: gel filtration, cross-linking, and small angle x-ray scattering (SAXS) analysis. *J Biol Chem* 279, 55760-55769 (2004)
6. Enoki, S.; Saeki, K.; Maki, K. and Kuwajima, K. Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry* 43, 14238-14248 (2004)
7. Iizuka, R.; So, S.; Inobe, T.; Yoshida, T.; Zako, T.; Kuwajima, K. and Yohda, M. Role of the helical protrusion in the conformational change and molecular chaperone activity of the archaeal group II chaperonin. *J Biol Chem* 279, 18834-18839 (2004)
8. Inobe, T. and Kuwajima, K. Phi value analysis of an allosteric transition of GroEL based on a single-pathway model. *J Mol Biol* 339, 199-205 (2004)
9. Kamagata, K.; Arai, M. and Kuwajima, K. Unification of the Folding Mechanisms of Non-two-state and Two-state Proteins. *J Mol Biol* 339, 951-965 (2004)
10. Saeki, K.; Arai, M.; Yoda, T.; Nakao, M. and Kuwajima, K. Localized nature of the transition-state structure in goat alpha-lactalbumin folding. *J Mol Biol* 341, 589-604 (2004)
11. Ali, S.A.; Iwabuchi, N.; Matsui, T.; Hirota, K.; Kidokoro, S.; Arai, M.; Kuwajima, K.; Schuck, P. and Arisaka, F. Reversible and fast association equilibria of a molecular chaperone, gp57A, of bacteriophage T4. *Biophys J* 85, 2606-2618 (2003)
12. Arai, M.; Inobe, T.; Maki, K.; Ikura, T.; Kihara, H.; Amemiya, Y. and Kuwajima, K. Denaturation and reassembly of chaperonin GroEL studied by solution X-ray scattering. *rotein Sci* 12, 672-680 (2003)
13. Arai, M.; Kataoka, M.; Kuwajima, K.; Matthews, C.R. and Iwakura, M. Effects of the difference in the unfolded-state ensemble on the folding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. *J Mol Biol* 329, 779-791 (2003)
14. Inobe, T.; Arai, M.; Nakao, M.; Ito, K.; Kamagata, K.; Makio, T.; Amemiya, Y.; Kihara, H. and Kuwajima, K. Equilibrium and Kinetics of the Allosteric Transition of GroEL Studied by Solution X-ray Scattering and Fluorescence Spectroscopy. *J Mol Biol* 327, 183-191 (2003)
15. Inobe, T.; Kikushima, K.; Makio, T.; Arai, M. and Kuwajima, K. The allosteric transition of GroEL induced by metal fluoride-ADP complexes. *J Mol Biol* 329, 121-134 (2003)
16. Kamagata, K.; Sawano, Y.; Tanokura, M. and Kuwajima, K. Multiple parallel-pathway folding of proline-free *Staphylococcal* nuclease. *J Mol Biol* 332, 1143-1153 (2003)
17. Arai, M.; Ito, K.; Inobe, T.; Nakao, M.; Maki, K.; Kamagata, K.; Kihara, H.; Amemiya, Y. and Kuwajima, K. Fast Compaction of alpha-Lactalbumin During Folding Studied by Stopped-flow X-ray Scattering. *J Mol Biol* 321, 121-132 (2002)