

受賞者

榎 互介

名古屋大学 大学院理学研究科 物理学教室

## 研究テーマ

### 蛋白質のフォールディング・エネルギー地形と中間体アンサンブルの探索

#### 1. 背景と目的

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、特異的な天然立体構造を獲得する過程である。蛋白質フォールディングは、遺伝情報から生物学的機能に至る遺伝暗号発現の最終段階としてのみならず、より高次の構造形成を実現するために必須であり、さらにその原理を熱統計力学に求めることができるという点で、生物科学と物質科学との接点に位置する重要な過程である。統計力学や計算機シミュレーションを用いたフォールディング研究によると、蛋白質のフォールディングは、多自由度の漏斗型エネルギー地形を用いて記述することができると言われていたが、その自由度の多さ故に実験的にエネルギー地形を評価することは困難である。さらに、多くの蛋白質は、フォールディング過程の初期、典型的には反応開始後ミリ秒以内に中間体を蓄積する。しかし、これまで主として技術的な問題から反応開始後ミリ秒以内に起こる構造変化を観測することが困難であった。本研究においては、これまでにフォールディング研究で広く用いられてきたモデル蛋白質スタフィロコッカール・スクレアーゼ(SNase)を用いて、そのフォールディング・エネルギー地形を評価することを目標とした。具体的には、1. 従来速度論測定に用いられてきた方法よりも二桁近く短い時間領域から観測できる連続フロー装置を用いることによって、フォールディング初期からの構造形成過程の観測を可能にする、2. さらにSNaseの様々な部位にひとつだけトリプトファン残基(Trp)を導入した single-Trp 変異体およびその蛍光ラベル体を作成し、それらのフォールディングを特徴づけることにより、部位特異的に構造形成を観測し、SNaseのフォールディング・エネルギー地形を評価する、ことを目標とした。

#### 2. 方法

**連続フロー装置** 図1に示す蛍光連続フロー装置を作成した[1]。この装置について溶液の混合能率および観測の不感時間を評価した。240  $\mu\text{M}$  N-アセチル-L-トリプトファンアミド(NATA)をリン酸緩衝液と1:5の体積比で混合した際の蛍光強度の時間変化を観測することにより、二溶液の混合能率を評価した。同様にNATAを含むリン酸緩衝溶液(pH 7.0)を2.4、4.8、9.6、19.2 mM N-ブromoコハク酸イミド(NBS)と1:5の体積比で混合し、その蛍光強度の時間変化を観測することにより、装置の不感時間を評価した。測定は25  $^{\circ}\text{C}$ で行い、励起波長は295 nm、蛍光は320 nmの長波長フィルタを通してCCDカメラを用いて検出した。シリンジは1.5気圧の窒素で駆動し、流速は約1.5 mL/sだった。

**連続フロー法を用いたアポミオグロビン(apoMb)のフォールディング** Tealeの方法[2]を用いてウマ骨格筋のミオグロビン(シグマ・アルドリッチ)からヘムを取り除き、さらに遠心分離によって凝集体を取り除いた。得られたapoMbは凍結乾燥し、-20  $^{\circ}\text{C}$ で保存した。連続フロー装置内で、80  $\mu\text{M}$  apoMbを含む10 mMクエン酸ナトリウム/塩酸(pH 2.0)と10 mM クエン酸ナトリウム(pH 12.2または6.4)とを1:1の混合比で混合することにより、リフォールディング反応を開始した。混合後のapoMbの濃度は40  $\mu\text{M}$ 、pHはそれぞれ6.0、4.2であった。Trp蛍光強度の時間変化を観測することにより、apoMbのフォールディング速度論を観測した。

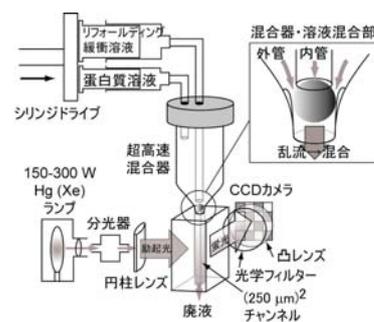


図 1. 連続フロー装置の概念図

single-Trp SNaseの作成と平衡論的測定 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、擬野生型(WT\*) SNase (野生型蛋白質のP47G/P117G/H124L変異体)に対して、V66W/W140H、F34W/W140Hの変異を導入し、Trpをそれぞれ66および34の位置にもつ変異体(W66およびW34 SNase)の遺伝子を作成した。作成した遺伝子を含む発現プラスミドによって大腸菌BL21(DE3)/pLyseSを形質転換し、これらの変異体を発現させた。発現した蛋白質は、硫酸分画、ゲル濾過、陽イオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過の順で精製し[3]、凍結乾燥の後-20 °Cで保存した。平衡条件下における測定では、5  $\mu$ MのW66 SNaseを含む80 mM 酢酸ナトリウム/0 - 8 M 尿素溶液(pH 5.2)を試料溶液として用いた。295 nmの励起光を用いて、300 - 450 nmの蛍光スペクトルを得た。それぞれの波長での蛍光強度の尿素濃度依存性には、少なくとも二つの転移が観測された。解析には天然(N)状態、中間体(I)、ほどけた(U)状態からなる三状態モデルを用いて、それぞれの状態間の安定性を評価した。

### 3. 結果と研究成果

連続フロー装置の性能評価 NATAのNBSによる消光過程を観測することにより、作成した連続フロー装置の不感時間が約100  $\mu$ sであることが分かった。図2は、240  $\mu$ M NATAを含むリン酸緩衝溶液(pH 7.0)を0 - 19.2 mM NBSを含むリン酸緩衝溶液(pH 7.0)と体積比1:5で混合

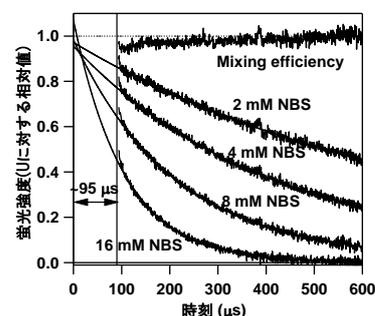


図 2. NATA による NBS の消光過程と混合能率

した際に得られるNATAの希釈とNBSによるNATAの蛍光の消光過程を示す。NATAのNBS非存在下での溶液による希釈は装置の混合能率を示し、溶液が混合器から出た直後に充分混合していることを示す。NBS存在下での消光過程は、一相の指数関数で表すことができた。フィッティング曲線をゼロ時刻方向に外挿し、NATAの希釈後の蛍光強度に至る時刻を求めた。この時刻は反応の開始時刻( $t_0$ )に対応する。また、フィッティング曲線と実験データとのずれがなくなる時刻( $t_1$ )から反応を観測できていることになる。装置の不感時間( $t_1 - t_0$ )は95  $\mu$ sであった。

作成した連続フロー装置を用いてapoMbのフォールディング初期過程を観測し、装置を蛋白質のフォールディング反応に適用した。apoMbは、ミオグロビンからヘムを取り除いた $\alpha$ -ヘリックスに富む蛋白質(153残基)で、フォールディング研究でモデル蛋白質としてしばしば用いられる。pH $\approx$ 6でひとつのヘリックス以外ホロ蛋白質と殆ど変わらないN状態にあり、pH $\approx$ 2.0で低塩強度条件下ではU状態が安定である。この蛋白

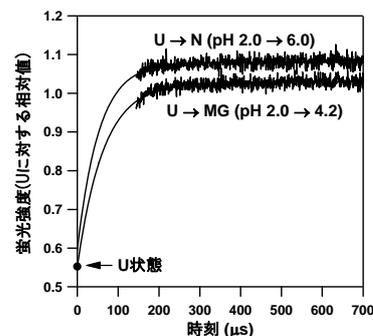


図 3. apoMb のフォールディング

質に特徴的なのは、pH 4.2の平衡条件下でモルテン・グロビュール(MG)状態を蓄積し、この中間体はフォールディング中間体に対応することである。蛍光連続フロー法を用いて、apoMbについて、pH 2.0 (U) から4.2 (MG) および6.0 (N) へのフォールディングの初期過程を25 °Cで観測した(図3)。得られた蛍光強度の時間変化を一相の指数関数にあてはめ、反応の時定数が55  $\mu$ sと65  $\mu$ sであることが分かった。また、フィッティング曲線の時刻ゼロへの外挿値がU状態の蛍光強度とほぼ一致した。このことは、本研究で用いている連続フロー装置でapoMbのフォールディング過程を曖昧さなく観測することができたことを示唆する。

SNaseのsingle-Trp変異体の平衡論的測定 SNaseの唯一のTrp残基をヒスチジンに置換したTrp-free変異体のPhe34、Val66をそれぞれTrpに置換したSingle-Trp変異体W34、W66 SNaseを作成した。Trpの蛍光をプローブとして、W66 SNaseの尿素によるアンフォールディング転移曲線を測定した。0-8 Mの尿素存在下で、励起波長295 nmで300 - 450 nmでの蛍光スペクトルを観測した。二状態転移を示す野生型蛋白質とは異なり、得られた転移曲線には少なくとも二つの転移が観測された。転移曲線の解析には、N状態、中間体(I)、U状態からなる三状態モデルを用いた。図4は、解析によって得られたW66 SNaseのN、I、U状態の蛍光スペクトルと各尿素濃度におけるそれぞれの状態の割合を示す。N状態の蛍光スペクトルの $\lambda_{max}$ は325 - 330 nmにあり、導入されたTrp側鎖は分子内に埋もれていることが示唆される。また、嵩高いTrp側鎖を導入したため、野生型と比較して天然状態は著しく不安定化した。中間体は、1-2 M 尿素存在下の穏和な変性条件下で蓄積し、天然様の蛍光スペクトルを示した。

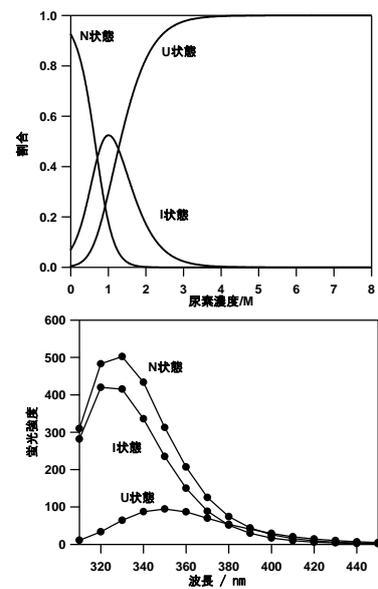


図4. W66のアンフォールディング転移に伴うN、I、U状態の割合と蛍光スペクトル

#### 4. 考察とまとめ

本研究の目標は、SNaseのsingle-Trp変異体およびその蛍光ラベル変異体を作成し、蛍光連続フロー法およびストップ・フロー法を用いてそのフォールディングを反応初期から観測することにより、SNaseのフォールディング自由エネルギー地形を評価することである。蛍光連続フロー装置を作成し、時定数約55  $\mu$ sを示すapoMbのフォールディング初期過程を観測することができることを確認した。SNase変異体については、Phe34およびVal66の位置にTrpを導入したsingle-Trp変異体を作成し、W66 SNaseの安定性を評価した。平衡条件下において、W66 SNaseは、WT\* SNaseと比較して天然状態は不安定化し、天然状態に類似する蛍光スペクトルを示すI状態を蓄積することが明らかになった。天然構造においてhelix H1のC末端近くに位置するW66は、I状態において部分的に分子内に埋もれていることが示唆される。今後は、この変異体のフォールディング速度論を連続フロー法およびストップ・フロー法を用いて明らかにする。さらにW66 SNaseに対して得られた結果に基づき、蛍光ラベル変異体のフォールディング速度論を明らかにすることによってSNaseのフォールディング機構をより詳細に理解する。

最後になりましたが、病態代謝研究会研究助成金をたまわることができたことで、本研究を進めることができました。また、研究遂行中に研究環境が変わった際も非常に柔軟な対応をして下さいました。ここに篤く御礼申し上げます。

#### 5. 発表論文、参考文献

発表論文: 該当なし

参考文献:

- [1] Shastry M. C., Luck, S. D. and Roder, H. *Biophys. J.* **74** (5), 2714 - 2721 (1998).
- [2] Teale F. W. J. *Biochem. Biophys. Acta.* **35**, 543 (1959).
- [3] Ikura, T. et al. *Biochemistry*, **36** (21) 6529 - 6538 (1997).