



高橋 聡

京都大学・大学院工学研究科・分子工学専攻

プロフィール：1989年東北大学修士。1992年総研大博士。分子科学研究所、AT&Tベル研究所、理化学研究所での博士研究員を経て、1996年より現職。専門：生物物理学、物理化学。趣味：阪神ファンの観察。

蛋白質の折れ畳み過程の実時間測定とその応用

研究の目的

蛋白質の折れ畳み問題とは、蛋白質を構成するアミノ酸の一次配列の情報をもとに、蛋白質が折れ畳んだ構造を推定する問題である。この問題を解くことは、各種のゲノムプロジェクトから得られる遺伝情報を効果的に利用するために必要であるほか、蛋白質が正しく折れ畳まないことに原因する疾病の対策にも手がかりを与えられると思われる。

蛋白質の折れ畳み問題は難しく、人間はまだ解法を持ち合わせていない。しかし、実際の蛋白質は、変性した紐状の状態から機能を持つコンパクトな状態に短時間内に折れ畳むことができる。この運動を観察すれば、折れ畳み構造を予測するための情報が得られると期待できる。

本さがけ研究で、我々は蛋白質の折れ畳み運動を実時間で観測する手段を開発した。開発した手法を幾つかの蛋白質に応用することで、折れ畳みに関する興味深い性質を発見することができた。

実験装置の開発

蛋白質の折れ畳み過程は、早いものは数ミリ秒以内に終わる。この過程をリアルタイムで観察するための実験装置を開発した。まず、高速の溶液混合装置を開発し、折れ畳み過程の時分割観測を可能にした。達成した混合時間 ($\sim 50\mu\text{s}$) は、従来の装置よりも二桁も短いものである。

次に、二次構造が多くコンパクトであるという蛋白質構造を特徴づける性質を直接観察するために、円二色性 (CD) 分光法、赤外 (IR) 分光法およびX線小角散乱法を使用した。X線小角散乱の測定のためには、SPring8で得られる強力なX線ビームが必要だった。以上の装置開発を行うことで、50マイクロ秒の時間分解能で、蛋白質の折れ畳みの全過程を測定することを可能にした。

実験結果

1) シトクロムcの折れ畳み過程

上記実験装置を用いて、シトクロムcが、折れ畳み開始後100マイクロ秒以内に中間体Iを作り、次に約500マイクロ秒の時定数で中間体IIを形成し、最後に約10ミリ秒の時間をかけて折れ畳み構造に変化することを観察した。

二つの折れ畳み中間体について、CD分光法によりヘリクス含量を見積もり、X線小角散乱によりコンパクトさを示す慣性半径 (Rg) を見積もった。図1に結果を示す。変性したシトクロムcは、慣性半径が大きくヘリクス含量が少ない構造を持つが、中間体Iから中間体IIへと折れ畳みが進むにつれ、ヘリクス含量と慣性半径がほぼ同期して段階的に成長することを明らかにした。

この結果は、シトクロムcが幾つかの部分構造に分けられ、異なるタイミングで折れ畳んでいることを示唆する。これは、全てのヘリクスが先に形成した後に収縮して蛋白質構造が作られる、などと考えた従来の折れ畳み機構とは異なる解釈である。

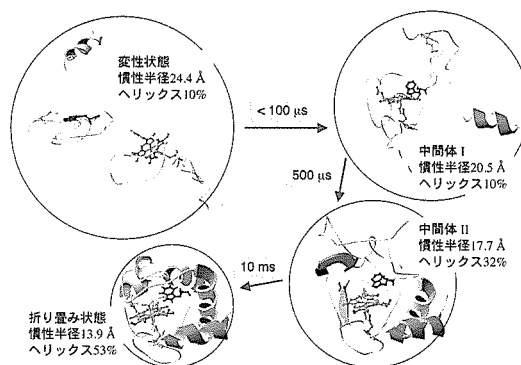


図1：シトクロム c の折れ畳み過程

2) ポリグルタミン酸のヘリクス形成過程

次に、ポリグルタミン酸がヘリクスを形成する過程を観察した。ポリグルタミン酸は、酸性条件ではヘリクス構造を、中性条件ではランダムコイル構造を持つ。しかし、単純なポリペプチドであるにもかかわらず、ヘリクス形成のタイムスケールでさえも不明で、活発な議論がなされていた。

時分割CD分光法と時分割IR分光法を用いて、中性から酸性へ

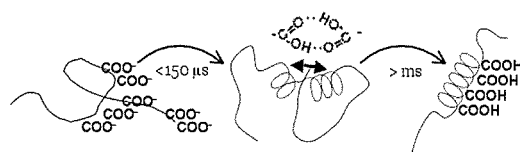


図2：ポリグルタミン酸のヘリクス形成過程

pHが変化する時のポリグルタミン酸の構造変化を測定した。その結果を図2に示す。ポリグルタミン酸は、pHジャンプの直後100マイクロ秒以内に、短いヘリックスが多数形成した状態を作り、さらに数ミリ秒の時間をかけて長いヘリックスを作ることが推定できる。最初に形成する短いヘリックスは、ポリグルタミン酸の側鎖間の水素結合により安定化していると解釈した。

3) アポミオグロビンの折り畳み過程

アポミオグロビンの折り畳み過程について、時分割CD測定とX線小角散乱測定を行った。折り畳みを開始した直後の百マイクロ秒の時点で、これまで観察できなかった新しい中間体が存在することを示した。この中間体は、慣性半径が収縮しているが、ヘリックスの成長は不十分だった。この結果も、アポミオグロビンの折り畳みが、幾つかの中間体を経て進むことを示している。

4) モネリンの折り畳み過程

以上の測定は、主に α ヘリックスを含む蛋白質を対象としていた。観察をさらに β シートを含む蛋白質に広げるために、モネリンの折り畳み過程を観測した。モネリンは、アミノ酸残基数が100程度の β シート蛋白質である。 β シートの構造を α ヘリックスと区別して検出するために、時分割FTIR分光法を使って折り畳み過程を観察した。

得られた結果は、折り畳んだ状態では β シートが多いにもかかわらず、折り畳み初期の数百マイクロ秒以内の段階では、 α ヘリックスが多く形成していることを示している。このヘリックスは揺らいでおり、1ミリ秒程度で消失して β シート構造に変化する。我々は、モネリンが折り畳みの初期にヘリックス構造を作ることで、疎水性残基の収縮を助けているのではないか、という仮説を立てた。

まとめと今後の展望

さきかけ研究の三年間を使って、我々は蛋白質の折り畳み過程を観察するための新しい実験装置の開発を行った。開発した装置は、サブミリ秒で起こる蛋白質の折り畳み過程を、蛋白質の慣性半径と二次構造含量で性格づけることを初めて可能にした。

幾つかの蛋白質やポリペプチドについての実時間測定の結果、折り畳み過程が、幾つかの段階的な運動を経て進むことを観察した。これらの結果より、蛋白質は幾つかの部分構造に分かれており、部分構造が次第に組みあがる形で折り畳みが進むのではないかと推定できる。

今後は、さらに異なる蛋白質の折り畳み過程を測定し、部分構造の特定および全体構造の違いの原因を追求したい。さらに、得られた知見を基に、複雑な蛋白質構造を記述できる理論的枠組みを作ることを目標としたい。

投稿論文

Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Nishikawa, Y., Fujisama, T.,
"Conformational Landscape of Cytochrome c Folding Studied by Microsecond-Resolved Small-Angle X-ray Scattering"
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.. 99. 1329-1334 (2002).

Kimura, T., Takahashi, S., Akiyama, S., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I.
"Direct Observation of the Multi-step Helix Formation of Poly-L-glutamic acids"
J. Am. Chem. Soc. 124. 11596-11597 (2002).

依頼論文

高橋 聡・秋山修志
「蛋白質の折りたたみ運動をとらえる」
蛋白質核酸酵素 46, 1514-1552 (2001).

高橋 聡
「蛋白質の折り畳み研究の展開」
生化学・印刷中