

蛋白質フォールディングの分子機構

桑島 邦博

岡崎統合バイオサイエンスセンター
戦略的方法論研究領域
生体分子物性研究部門 教授
(併)生命・錯体分子科学研究領域
生体分子機能研究部門



くわじま・くにひろ

1971年 北海道大学理学部卒業

1975年 同大学院理学研究科博士課程中退

1979年 理学博士

北海道大学教務職員、助手、東京大学助教授、教授を経て2007年1月より現職

はじめに

天然の球状蛋白質は、そのアミノ酸配列 (= 遺伝情報) によって決定づけられた、特異的な三次元立体構造に折り畳まり、その生物機能を発現する。Anfinsenの実験以来、球状蛋白質の特異的な立体構造の形成 (フォールディング) は物理化学の原理に基づいて起こると考えられている^[1]。蛋白質フォールディング分子機構の解明は生体分子科学の根源的課題の1つであるが、未だそれが達成されたとは言えない。われわれは、蛋白質フォールディングに関する研究を、「(1) 試験管内の蛋白質フォールディングの実験とシミュレーション、(2) 細胞内の蛋白質フォールディング介助に関わる分子シャペロンの作用機構、(3) 蛋白質フォールディングとヒトの疾患との関係」の三つの観点から行っている。(2) に関わる研究成果については、本年度の「機器センターたより」^[2] に書かせていただいたので、本稿では、(1) に関わる研究成果について紹介する。

蛋白質フォールディングの古典的見解と新しい見解

今から50年も前にAnfinsenは蛋白質フォールディングの熱力学仮説を提唱したが、熱力学だけではフォールディング分子機構を理解出来ないことに最初に気付いたのはLevinthalであった。彼は思考実験によって、100残基の蛋白質がランダムサーチで可能な全てコンフォメーションを経験しながら天然構造に至るには超天文学的な時間が必要なこと (Levinthalのパラドックス) を示し、蛋白質フォールディングにはアミノ酸配列によって規定された特異的な経路が存在し、経路上には特異的なフォールディング中間体が存在するはずだと主張した (図1(a))^[1,3]。その後、このようなフォールディング中間体を検出し特徴付けることがフォー

ルディング研究の主要な流れとなり、この流れに沿った考え方をフォールディングの「古典的見解」という。筆者が関わった、球状蛋白質のモルテン・グロビュール (MG) 状態はこのような蛋白質中間体の代表的なものであり、多くの球状蛋白質 (通常100残基以上) についてフォールディング中間体の特徴付けがなされた^[3]。

1990年代になると、キモトリプシン・インヒビター2を始めとする100残基以下の小さな蛋白質において、中間体を経ずに二状態的に天然構造に折り畳まる例が次々と報告された (図1(b))^[4]。中間体は正しいフォールディングにとって必須ではなく、むしろ、間違っただフォールディングによって速度論的

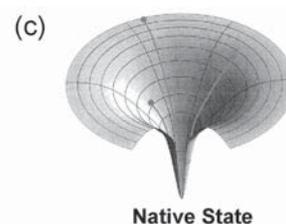
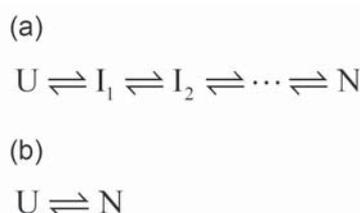


図1 蛋白質フォールディングのモデル。(a) 中間体を伴う非二状態フォールディング、(b) 二状態フォールディング、(c) ファネルモデルの概念図。

に捕捉された状態であるとの主張がなされた。丁度時期を同じくして、蛋白質の簡単なモデル（蛋白質の主鎖構造のみをあらわに含んだC α モデルなど）を用いた理論的な研究によりフォールディングのエネルギー地形理論が生まれた。この理論によると、正しいフォールディングにとって特異的な経路や中間体は必須ではなく、コンフォーメーション-エネルギー超空間におけるエネルギー地形がファネル状で、常に天然構造に向かった傾きを持っていればよい（ファネルモデル）（図1(c)）^[5]。このようなエネルギー地形理論に基づく考え方をフォールディングの「新しい見解」という。

1998年にPlaxco等は、二状態蛋白質（その当時全部で12種）のフォールディング速度が主鎖構造のトポロジカルな複雑さと顕著な負の相関を持つことを示した。この結果は、フォールディングの律速段階が、天然主鎖構造のトポロジカル探索によってもたらされるエントロピー障壁であることを示しており、「新しい見解」を支持するものだと考えられている^[6]。このPlaxco等の発見以来、二状態蛋白質の実験データがたくさん蓄積され、現在では、主鎖

構造のトポロジカルな複雑さが蛋白質フォールディング機構を決める要因であることが定説となりつつある。

それでは、はたして、フォールディングの「古典的見解」と「新しい見解」は互いに相容れないものであろうか。単純な二状態フォールディングと中間体を伴った非二状態フォールディングの、いずれが、現実の蛋白質フォールディングをより正しく表しているのであろうか。この疑問に答えるため、非二状態蛋白質の中間体形成の速度定数 (k_I) と天然状態形成の速度定数 (k_N) がどのように主鎖構造のトポロジカル・パラメータに依存するかが調べられた^[7,8]。図2は、 k_I と k_N が天然主鎖構造の遠隔配列天然コンタクト対の数（一時配列上離れた残基同士のコンタクト対の数）(Q_d) にどのように依存するかを示している。 k_I と k_N のいずれも Q_d に同じように依存し、その依存性は二状態蛋白質の k_N の Q_d 依存性に類似していることがわかる。 Q_d 値の小さなところでは、二状態蛋白質の k_N は非二状態蛋白質の k_I に近く、 Q_d 値の大きなところでは、それは非二状態蛋白質の k_N に近くなる。以上の事実は、二状態フォールディングと非二状態フォールディングの背景にあ

る物理機構は同じであり、二状態フォールディングは中間体の不安定化などによって非二状態フォールディングが単純化したためにもたらされたと考えることができる。

ヤギ α ラクトアルブミンとイヌ乳リゾチームのフォールディング

ヤギ α ラクトアルブミン (GLA) とイヌ乳リゾチーム (CML) は相同蛋白質であり、両者は41%の配列同一性を有し、主鎖の立体構造も実質上同一である。天然主鎖構造のトポロジカル探索によってフォールディング機構が決まるとする理論に従えば、同じ主鎖構造を有する相同蛋白質のフォールディングは同じ機構で同じような遷移状態を経て進行するはずである。事実、相同蛋白質のフォールディング遷移状態が類似している例はいくつか知られている。しかし、われわれは、最近、GLAとCMLのフォールディング経路や遷移状態が大きく異なることを見出した^[9,10]。

GLA、CMLともに非二状態蛋白質であり、フォールディング反応初期にMG状態が蓄積し、MG状態から天然

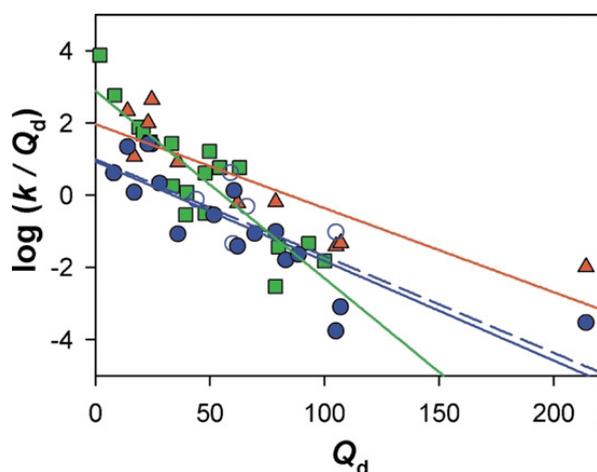


図2 非二状態フォールディングを示す蛋白質のフォールディング速度定数 (k_I (赤三角)、 k_N (青丸)) と二状態蛋白質のフォールディング速度定数 (k_N (緑四角)) の Q_d 依存性^[7]。白丸は速度定数の変性剤濃度依存性から非二状態蛋白質であることが期待されるが、中間体が直接検出されていない5つの蛋白質のデータ (k_N) を示す。

状態の形成される過程が律速段階である。両蛋白質とも、 β サブドメインのC末端側とCヘリックスのN末端側に挟まれたループにカルシウムイオンを強く結合するカルシウム結合蛋白質である。われわれは、MG状態の水素重水素交換2次元NMR解析とストップトフロー蛍光スペクトルを用いたフォールディングの速度論的解析を行い、GLAとCMLのフォールディング経路と遷移状態の構造を明らかにした^[10]。図3はその結果を示す。GLAのMG状態ではCヘリックスとカルシウム結合部位の構造が一部形成され、天然状態に比べると1,000倍以上弱い、カルシウム結合能を一部回復する。遷移状態では、Cヘリックスとカルシウム結合部位周辺がさらに構造化し、カルシウム結合定数は天然状態の1/10程度にまで

回復する(図3の下の経路)。一方、CMLのMG状態では、カルシウム結合部位から離れたAヘリックスとBヘリックスの構造が一部形成される。遷移状態ではこの部分の構造形成がさらに進むが、カルシウム結合部位の構造は壊れたままで、カルシウム結合能は全く回復していない(図3の上の経路)。このように、GLAとCMLではフォールディング開始部位と遷移状態の構造が大きく異なる。GLAとCMLは実質上同一の主鎖構造を持つので、主鎖構造のトポロジカル探索が蛋白質フォールディングにおいて支配的役割を担っていると最近の理論では、両者の違いを説明することは不可能である。

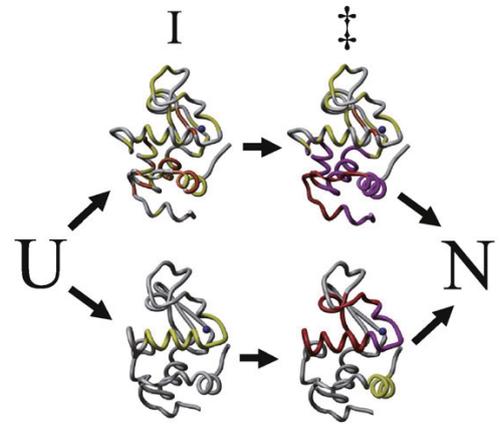


図3 GLA(下)とCML(上)のフォールディング反応^[10]。Iはフォールディングの初期中間体を‡は遷移状態を示す。黄色の部分は天然コンタクトが10%以上回復している領域、赤は30%以上、マゼンダは60%以上回復している領域を示す。

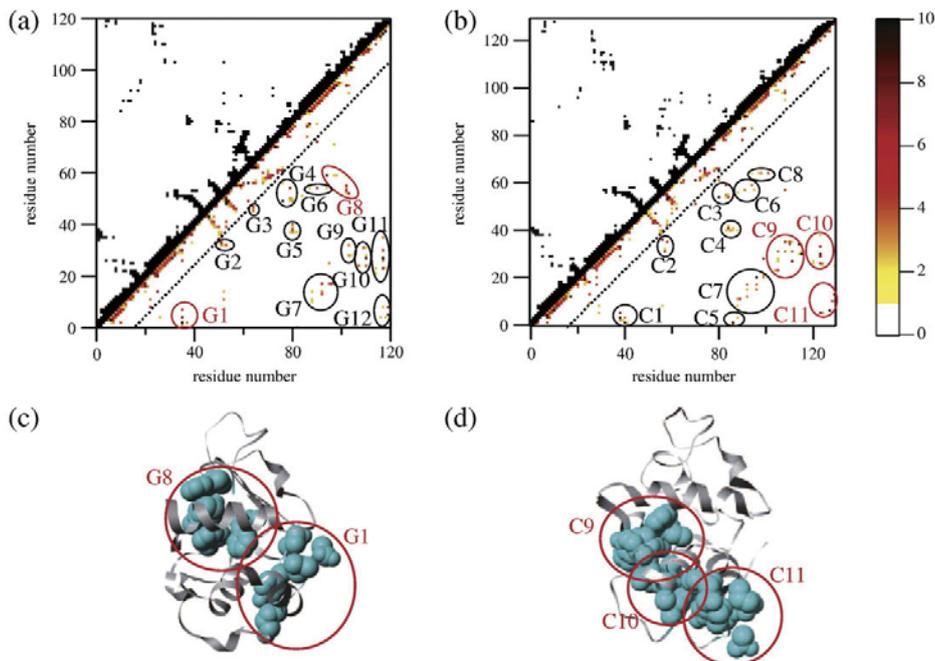


図4 GLA(a)とCML(b)の残基-残基原子コンタクトマップ^[10]。丸で囲われた領域は非局所的コンタクトクラスターであり、赤丸で囲われた領域は強いクラスターを示す。(c)と(d)の実体積模型は強いクラスター中で強くコンタクトしている残基対を示し、これらがフォールディングの開始部位になっていると考えられる。

側鎖間相互作用と フォールディング開始部位

われわれの以前の研究より、非二状態蛋白質のフォールディング速度は非局所的コンタクト・クラスター数 (N_C) と良く相関することがわかっている^[8]。 N_C は蛋白質の天然三次元構造を表すコンタクト・マップから求められ、 α ヘリックスや β ヘアピンなどの構造単位間の相互作用領域の数を表していると見なされる。図4はGLAとCMLのコンタクト・マップであり、丸で囲まれた領域が非局所的コンタクト・クラスターである (GLAでは $N_C=12$ 、CMLでは $N_C=11$)。さらに、図4では、コンタクト・マップに側鎖間の相互作用も含めるため、コンタクトしている残基間の原子-原子コンタクトの総数を10段階で表示してある。コンタクト数が4以上の残基対を強くコンタクトしている残基対とし、強くコンタクトしている残基対が4以上のコンタクト・

クラスターを「強いクラスター」と定義した^[10]。そうすると、GLAとCMLで、強いクラスターのコンタクト・マップ上の分布が大きく異なることがわかる。GLAではG1とG8が強いクラスターであり、G8はCヘリックスと β サブドメイン間に位置し、これは丁度フォールディング開始部位に相当する。CMLではC9、C10、C11が強いクラスターであり、これらはCMLのフォールディング開始部位であるAヘリックスとBヘリックスの近傍に位置する。

以上の結果より、側鎖間相互作用も含めた残基間の相互作用強度を取り入れることにより、GLAとCMLとの間のフォールディング経路の違いを合理的に説明できることがわかった。

まとめと今後の展開

二状態蛋白質に対しては主鎖構造のトポロジカル探索がフォールディング機構を決めることが定説となりつつ

あるが、同じ考えを、より複雑な非二状態蛋白質にそのまま拡張することはできない。GLAとCMLの強いクラスターを形成する残基対を調べてみると、TrpやTyrなどの芳香族残基と嵩高い側鎖を持った残基間の対が多いことがわかった^[10]。芳香族側鎖と嵩高い側鎖間の相互作用が蛋白質フォールディング開始部位に一般的に見出されるか否かは、今後、フォールディング開始部位が実験的に明らかにされている蛋白質を網羅的に調査することにより明らかとなる。計算分子科学の進歩により、小さな球状蛋白質については、1ミリ秒のオーダーの全原子分子動力学シミュレーションが可能になりつつある^[11]。分子シミュレーションを用いて、GLAやCMLくらいの大きさの蛋白質のフォールディング開始部位とフォールディング経路の詳細が明らかになるのも遠い先の話ではない。

参考文献

- [1] C.B. Anfinsen and H.A. Scheraga, *Adv. Protein Chem.* **29**, 205–300 (1975)
- [2] 桑島邦博, 分子科学研究所「機器センターたより」No. 11, 57–61 (2011)
- [3] M. Arai and K. Kuwajima, *Adv. Protein Chem.* **53**, 209–282 (2000)
- [4] S.E. Jackson, *Fold. Des.* **3**, R81–R91 (1998)
- [5] P.G. Wolynes, J.N. Onuchic and D. Thirumalai, *Science* **267**, 1619–1620 (1995)
- [6] D. Baker, *Nature* **405**, 39–42 (2000)
- [7] K. Kamagata, M. Arai and K. Kuwajima, *J. Mol. Biol.* **339**, 951–965 (2004)
- [8] K. Kamagata and K. Kuwajima, *J. Mol. Biol.* **357**, 1647–1654 (2006)
- [9] K. Kuwajima, T. Oroguchi, T. Nakamura, M. Ikeguchi and A. Kidera, *In Water and Biomolecules—Physical Chemistry of Life Phenomena*, (K. Kuwajima, Y. Goto, F. Hirata, M. Kataoka and M. Terazima, eds.), pp. 13–35 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2009)
- [10] T. Nakamura, K. Makabe, K. Tomoyori, K. Maki, A. Mukaiyama and K. Kuwajima, *J. Mol. Biol.* **396**, 1361–1378 (2010)
- [11] K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R.O. Dror and D.E. Shaw, *Science* **334**, 517–520 (2011)