



サブミリ秒分割 X 線小角散乱法の開発と蛋白質の折り畳み過程の研究

高橋 聡 大阪大学蛋白質研究所 〒565-0871 吹田市山田丘 2-1
 鶴澤尊規 京都大学大学院工学研究科分子工学専攻 〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 A クラスター C133
 秋山修志 理化学研究所播磨研究所/SPring-8 〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1
 藤澤哲郎 理化学研究所播磨研究所/SPring-8 〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都 1-1-1

要旨

蛋白質が、無数の変性構造のなかから唯一の折り畳み構造を選び出す機構を理解するために、蛋白質の折り畳み過程の中で、分子全体のコンパクトさや形がどのように変化するかを観測する必要がある。このため、サブミリ秒の時間分解能で X 線小角散乱を観測する実験システムを制作し、シトクロム *c* とアポミオグロビンの折り畳み過程を観察した。得られた結果は、これらの蛋白質の二次構造と三次構造が大まかには協同的に形成することを示した。しかし、折り畳み過程の最も初期の相では主鎖の大規模な収縮が起きることが明らかになった。これら観察から、初期の主鎖の収縮により形成された疎水的な環境により、ヘリックス形成が誘起されるという一般的な折り畳み機構を提案した。

1. はじめに

蛋白質は、アミノ酸の一次配列により規定される唯一の三次元構造に、自発的かつ短時間で折り畳むことのできるポリペプチドである。これは、Anfinsen らが1950年代に確立した蛋白質の一般的な性質だが¹⁾、この性質を逆に捉えれば、蛋白質の三次元構造はアミノ酸の一次配列から予測できるはずである。この予測が可能になれば、現在大量に集積されている DNA の配列情報の解読や新規蛋白質の設計などを進める際の必須の道具となるはずである。また、狂牛病やアルツハイマー病など、蛋白質が正しく折り畳まない場合に引き起こされる病気の解明にも役立つと思われる。そのため、蛋白質の構造予測を目指した研究が現代まで活発に続けられている。一つのテーマが長く研究されることは、このテーマの難しさと研究者を惹きつける面白さを示している。

蛋白質の構造予測が難しい主な要因は、折り畳んだ蛋白質はほぼ唯一の構造（コンフォメーション）をもつことに対し、変性した蛋白質は、無限に近い数の互いに異なるコンフォメーションから成る分子の集合体だと考えられることである。「無限のコンフォメーションの中から唯一の構造を有限時間内に選び出すこと」は、物理問題としては不可能である。しかし、この不可能なことを、生物は当たり前のように行っている。これは Levinthal のパラドックスと呼ばれる²⁾。蛋白質の構造予測のためには、自然の蛋白質がなぜ変性状態から折り畳み構造を選び出せるのかを理解する必要がある。

そこで、多くの蛋白質について、折り畳み過程の構造変化を実験的に調べる研究が行われてきたが、この研究は難しいことで悪名が高かった。例えば、蛋白質の変性状態の構造は、溶媒の影響を受けやすいため、結晶状態ではなく

溶液状態で観測しなければならない。しかし、溶液中で蛋白質の構造を調べられる手法は少なく、ヘリックス含量などの限られた情報しか得られない。また、短寿命の折り畳み中間状態の観測はさらに難しい。このため、折り畳み過程に関する一般的な知見を得るためには、新しい実験手法を開発し、個々の蛋白質についての知識を積み重ねるという多方面の努力が現在でも必要である。

我々の研究グループでは、放射光を使った X 線小角散乱 (SAXS) の時分割測定装置を開発し、折り畳みの中間状態にある蛋白質の大きさや形を観察することで、蛋白質の折り畳み問題に取り組んできた^{3,4)}。我々と独立に同目的の実験装置が報告されているが⁵⁾、我々の装置は、測定の感度や時間分解能において随一の性能を持ち、結果は高い評価を得ている^{6,7)}。本総説では、蛋白質の折り畳み研究に、なぜ時分割 SAXS 観測が必要なのかを説明し、我々が開発した装置と測定技術を紹介したい。さらに、この測定システムを使って我々が現在までに得た成果を総括し、今後の展望をまとめたい。

2. ヘリックス形成が先か主鎖の収縮が先か？

蛋白質が実際に変性状態から折り畳み状態に変化する際に、どのような構造変化を示すだろうか？ この構造変化には、無数の変性構造の中から唯一の折り畳み構造を選び出す自然の手法が隠されているはずである。従って、この構造変化を観測することで、折り畳み構造を予測するための手がかりが得られると期待できる。我々は、以下の理由により、蛋白質主鎖の収縮や全体の形に関する情報を得ることが必要だと考えた。

蛋白質構造の特徴として、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造が多く含まれることが挙げられる。そのため、

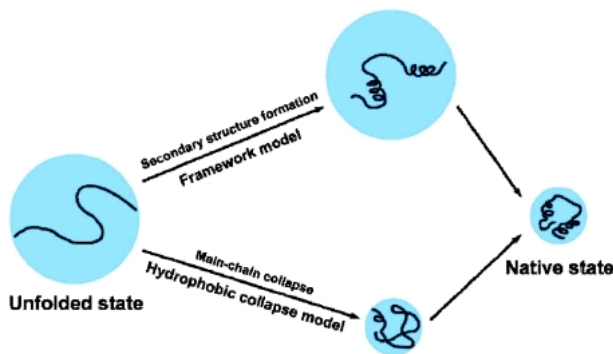


Figure 1. Illustration of the two representative pathways of protein folding.

蛋白質が折り畳む際の構造変化として、始めに二次構造が作られ、それらが組合わさることで折り畳み構造ができるというシナリオを直感的に考えることができる (Fig. 1)。これは、フレームワークモデルなどの名称で呼ばれる折り畳み機構である⁸⁾。このモデルに従うと、アミノ酸配列上で二次構造を作る部分を推定することで、折り畳み構造の予測は簡易化されるはずである。

しかし、「単純なフレームワーク機構は成り立たないのではないか?」と思わせる事実も多く存在する。例えば、蛋白質を切断したポリペプチド断片は、ほとんどの場合に二次構造を維持できない⁹⁾。このことは、二次構造を作る際に、配列上で離れた残基同士の接触も必要であることを示している。この考えを強調した折り畳み経路は、疎水的収縮モデルと呼ばれる¹⁰⁾。このモデルでは、蛋白質は主鎖をいったん収縮させた後に、部分的に作られた折り畳み構造を核として二次構造と三次構造を形成すると考える (Fig. 1)。

以上の二つの折り畳み機構は、「ヘリックス形成が先か主鎖の収縮が先か?」という違いを、極限にまで突き詰めた場合の機構である。これらの機構を検証するには、実際の蛋白質の折り畳み過程を観察し、二次構造形成と主鎖の収縮のタイミングを決定すればよい。これらの実験は単純だが、蛋白質が折り畳む過程で形成する中間体の寿命が大変短いために、長い間不可能だった。

我々は、蛋白質の折り畳み過程を実時間で観測することを目的として、実験装置の開発と研究を進めてきた。我々が研究を開始した時点では、ミリ秒以内の折り畳み過程を観察する実験はあまりなされていなかった。特に、円二色性 (CD) 分光法を使って比較的容易に観測できる二次構造形成と異なり、主鎖の収縮を検出する手法の開発が遅れていた。数ミリ秒よりも長い時間領域を観測した先駆的な研究の成果として、主鎖の収縮は非常に早く、数ミリ秒以内にほとんど完了することが報告されていた^{11,12)}。しかし、速い時間分解能で主鎖の収縮過程を直接観察しない限り、ヘリックス形成と収縮のどちらが先かを判断することはできない。そのため、我々はサブミリ秒の時間領域で主

鎖の収縮過程を観察する手段として、時分割 SAXS 観測システムを開発した³⁾。本システムは、溶液中の蛋白質の回転半径や形状などの情報を与えるほぼ唯一の手法である SAXS と、二つの溶液を短時間内に混合する装置を組み合わせたものである。このシステムにおける SAXS 測定は、SPring-8 の理研構造生物学ビームライン I (BL45XU-SAXS) の寄生散乱の低い光学系と高輝度挿入光源を用いることで初めて可能となった。

3. サブミリ秒領域での時分割 SAXS 測定

次に、我々が開発した装置と測定技術を紹介する。蛋白質の折り畳み過程は、変性剤濃度や pH などを溶液混合によりジャンプさせることで引き起こすことができる。溶液混合を過渡現象の観察に応用する場合、目的とする現象よりも短い時間内に溶液を混合する必要がある。我々は、以前にサブミリ秒で二つの溶液を混合できるミキサーを開発していたため¹³⁾、このミキサーを改良し、時分割 SAXS 装置に応用した。開発した観測システムの概略を Fig. 2 に示す³⁾。厚さが 1 mm のステンレス板に T 字型のスリットを加工し、高分子フィルムでサンドイッチすることで流路を形成する。流路の「うで」の部分から二つの溶液を導入し、中心部分で乱流を作ることで高速混合する。混合された試料は、観測流路を定常的に流れるが、この流路に X 線を照射することで SAXS 観測を行う。溶液の混合点と X 線の照射位置を変えることで、時分割測定を達成できる。試料の流速は、1~4 m/s の範囲が利用できる。

Fig. 2 の挿入図に、26C の水溶液を使って観察したミキサーの溶液混合パターンを示す。このパターンと流速 (2.53 m/s) から、二つの溶液が衝突してから混合されるまでの時間を約 200 μ s と見積もることができる。溶液の混合は温度や溶液の組成などによって変動するため、条件ごとに溶液混合を確認する必要があった。短時間で効率良く混合するためには、二つの溶液を高速で混合点に導入することが必要であった。そのため、溶液導入部の流路幅を 35 μ m まで狭めた。流路の加工には、厚さ 1 mm のステンレス板でも 35 μ m 幅の溝を正確に工作できる放電加工法を採用した。窓材にはマイラーやカプトンなどの高分子フィルムを使用した。これらのフィルムは、丈夫で散乱が少ない利点を持つが、柔軟性が少ないために、ステンレス板との隙間から溶液漏れを起こしやすい。そのため、フィルムの端面を反り返らせないなどの工夫とともに、セル全体を左右から強く締め付ける必要があった。

開発したシステムを、SPring8 の理研構造生物学ビームライン I ・小角散乱ステーション (BL45XU-SAXS) に設置した¹⁴⁾。測定には波長 1.5 \AA の X 線を使用し、散乱を感度の高いインテンシファイア付き CCD 検出器により観測した。しかし、このセットアップにより得た散乱強度は、測定の度にわずかな強度変化を示し、蛋白質試料の散乱から正確に参照試料の散乱 (ベースライン) を差し引く

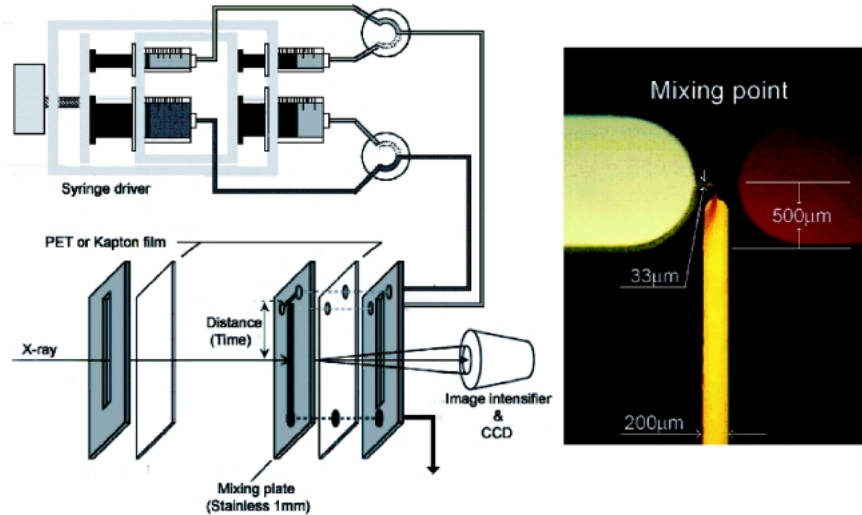


Figure 2. Schematic drawing of the rapid solution mixer developed for the measurements of submillisecond-resolved SAXS profiles. A stainless mixing plate with 1-mm thickness is placed between two films, which are tightened between two metal plates. The denatured protein solution and refolding buffer are placed in the 25-ml and 5-ml syringes, respectively, in the left of the syringe driver. The other pair of syringes in the right of the driver are filled with solutions for the baseline measurements. The two sets of the solutions are supplied consecutively to the mixing plate by the automated valves without stopping the flow. The mixed solution flows inside the observation slit (200- μ m width), where the incident x ray (1.5 Å) was irradiated. The picture in the right shows the mixing profile of the device obtained by using the pH-induced discoloration reaction of bromocresol purple. The dark region corresponds to the unmixed solution region.

ことが難しかった。これは、放射光の強度揺らぎ以外に、光路長が試料の違いにより微妙に変化することも原因していると思われる。そのため、できるだけ同じ条件でベースラインを観測する目的で、蛋白質試料と参照試料を共に送液ポンプに設置し、送液を止めることなく両試料を連続的に観測する工夫を行った (Fig. 2)。

我々が開発した装置は、最短で160 μ s という高い時間分解能と、低濃度の試料を正確に観測できる特徴を持っている。特に、以下に説明するアポミオグロビン (分子量は約17000) の場合は、1.3 mg/ml という低濃度での測定にも成功した。これは、きわめて困難な測定であり、挿入光源型 SAXS 用ビームライン (BL45XU-SAXS) の使用と¹⁴⁾、送液を止めずに丁寧に差散乱を測定する手法なしでは不可能だった。一方で、装置は大量に試料を消費する欠点も持っている。一つの蛋白質について一連の測定を完成させるまでに、5~10グラムの試料が必要だった。

4. シトクロム c の折り畳み過程

開発した装置を使って、最初にシトクロム c (cyt c) の折り畳み過程の観測を行った³⁾。cyt c は、アミノ酸残基数が104の球状蛋白質で、Fig. 3 に示すように、蛋白質の中心部に位置するヘムとそれを取り囲む数本のヘリックスから形成される¹⁵⁾。ヘムは主鎖と共有結合で繋がれているため、cyt c が変性しても外れない。そのため、濃いグアニジン塩酸塩溶液や酸性溶液などにより、cyt c は可逆的な変性を示す。

cyt c の折り畳みの過程として、pH 2 の酸変性状態 (U

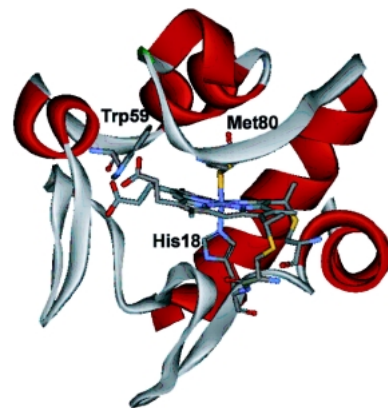


Figure 3. The folded structure of cyt c¹⁵⁾. The heme is ligated by histidine 18 and methionine 80.

状態) から pH を4.5にジャンプさせた後の動的過程がよく研究されてきた。折り畳み開始後100 μ s 以内の最初の過程として、主鎖が収縮した最初の間mediate (I₁ 状態) が形成することが、59番目のトリプトファン残基の蛍光のヘムによる消光から結論された¹⁶⁾。さらに、数百マイクロ秒の後に第二の間mediate (I₂ 状態) が、数ミリ秒の後に折り畳み状態 (N 状態) が作られることが、円二色性 (CD) 分光法を使った測定により解明された¹⁷⁾。U 状態と I₁ 状態のヘリックス含量 (f_H) は~12%、I₂ 状態は~37%、折り畳み状態 (N 状態) は~50%である¹⁷⁾。以上のように、cyt c の折り畳み過程は、ヘリックス含量を次第に増加させた複数の間mediateを経て進行する。しかし、各間mediate

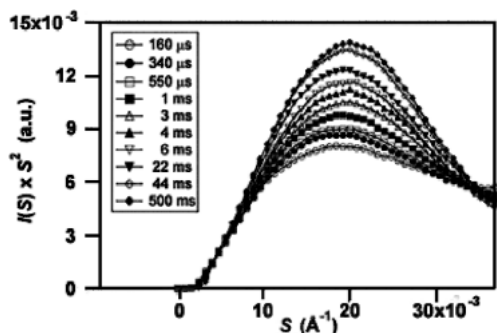


Figure 4. Time-resolved changes in the scattering profiles during the cyt *c* folding initiated by a pH jump from 2.0 to 4.5³⁾. The scattering profiles are presented as the Kratky plots.

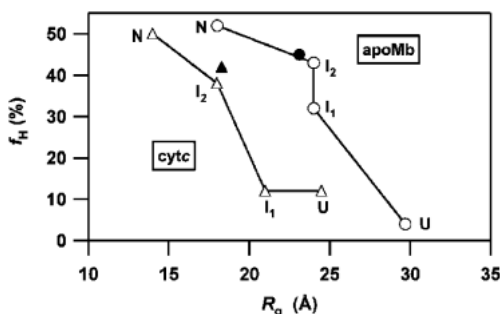


Figure 5. Comparison of the folding trajectories determined for cyt *c* and apoMb in the conformational space defined by α -helical content (f_H) and the radius of gyration (R_g). The open triangles and circles correspond to the folding trajectories for cyt *c*³⁾ and apoMb⁴⁾, respectively. The closed triangle and circle represent the static folding intermediates for cyt *c*²⁵⁾ and apoMb²⁶⁾, respectively.

の大きさや形などの情報は得られていなかった。

開発した装置を使うことで、cyt *c* の折り畳み過程の時分割 SAXS 測定を行った³⁾。得られた時分割データを、**Fig. 4** に Kratky プロットの形で示す。このデータを多成分解析することにより、 I_1 および I_2 状態に対応する散乱曲線を計算した。さらに、これらの曲線にギニエ解析を行い、 I_1 と I_2 状態の回転半径 (R_g) を算出した。**Fig. 5** は、横軸を回転半径、縦軸をヘリックス含量として、各中間体について得られた結果をプロットしたものである。U 状態が収縮することで I_1 状態を形成し、次にヘリックス形成と収縮を段階的に行うことで、 I_2 状態と N 状態が作られる様子が理解できる。

得られた SAXS データから、各中間体の動径分布関数を計算することができる。動径分布関数は分子内の全ての 2 原子間距離分布を示す。この計算結果も、 I_1 状態で cyt *c* が収縮したドメイン構造を持ち、このドメインの割合が I_2 状態で増えることを示した。以上のデータは、cyt *c* の折り畳みは主鎖の収縮を契機として進むこと、その後は収縮とヘリックス形成が同期することを示している。

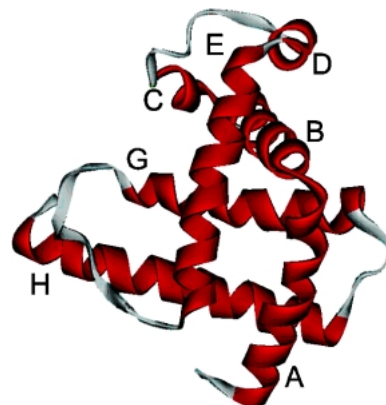


Figure 6. The folded structure of apoMb¹⁸⁾. The helices are labeled A~E, G and H from the N to the C terminal.

5. アポミオグロビンの折り畳み過程

我々は、次にアポミオグロビン (apoMb) の折り畳み過程を観察した⁴⁾。apoMb は、酸素貯蔵を行うミオグロビンの補欠分子族を取り除いた蛋白質で、**Fig. 6** に示すように A~E, G, H とラベルされる 7 本のヘリックスが組合わさった折り畳み構造を持っている¹⁸⁾。アミノ酸残基数は 153 であり、折り畳んだ状態でのヘリックス含量は ~55% である。

apoMb も、cyt *c* と同じく pH によって可逆的に変性・再生させることができる。pH 2 では酸変性状態 (U 状態) となり、ヘリックス含量が少なく ($f_H=5\%$) 回転半径の大きい ($R_g=29.7 \text{ \AA}$) 構造を持つ。また、pH 4.2 では A, G, H ヘリックスが形成した平衡中間状態が作られる ($f_H=33\%$)¹⁹⁾。さらに、酸変性した apoMb を含んだ溶液の pH を中性付近にジャンプさせると、数ミリ秒以内に A, G, H ヘリックスが形成した折り畳み中間体が観察され、さらに 100 ミリ秒ほどの時間をかけて折り畳み状態 (N 状態) が作られる²⁰⁾。ミリ秒領域に観察される速度論的の中間状態は、pH 4.2 で形成する平衡中間状態と同じ構造を持つと考えられている。しかし、ミリ秒以内に起こる構造変化について、これ以上の詳しい情報は得られていなかった。

我々は始めに、apoMb の折り畳み過程について時分割 CD 測定を行った⁴⁾。得られた結果は、ヘリックス含量の異なる二つの速度論的の中間体に関わることを示していた。これらを、 I_1 中間体 ($f_H=30\%$) および I_2 中間体 ($f_H=44\%$) とする。いくつかの証拠から、これらの状態は、U 状態と N 状態の間を段階的につなぐ速度論的の中間体だ ($U \rightleftharpoons I_1 \rightleftharpoons I_2 \rightleftharpoons N$) と推定できた²¹⁾。

次に我々は、時分割 SAXS 測定を行った。cyt *c* の場合には ~20 mg/ml という高濃度でも多量体を形成しなかったが³⁾、apoMb の場合は、多量体形成を防ぐために 1.3 mg/ml という低い濃度で SAXS 観測を行う必要があった。**Fig. 7** に、得られた散乱曲線をギニエ解析することによ

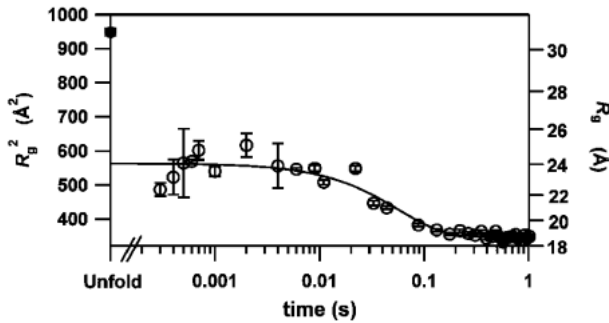


Figure 7. Time-dependent changes in the radius of gyration (R_g) obtained from the Guinier analysis of the SAXS profiles during the apoMb folding initiated by a pH-jump from 2.2 to 6.0⁴⁾.

り計算した回転半径の時間変化を示す。プロットから明らかのように、折り畳み開始後300 μ s という短時間内に大規模な主鎖の収縮が観察された。収縮した状態は、CD 観測から推定した I_1 状態に対応する。また、このプロットは、 I_2 状態と I_1 状態が同じ回転半径を持つことと、 I_2 状態から N 状態が形成する変化を示している。以上の測定により得られた apoMb の回転半径とヘリックス含量の変化を、Fig. 5 に示した。

I_1 状態の動径分布関数を計算したところ、折り畳み開始後300 μ s の時点で、コンパクトなドメイン構造が形成していることが示された。動径分布関数から収縮したドメイン部分の原子数を見積もると、apoMb を構成する全原子数の約80%以上にも達していた。一方で、apoMb の折り畳み中間体で形成が確かめられている A, G, H ヘリックスを合わせた原子数は40%程度にすぎない。従って、 I_1 状態で収縮したドメインには、A, G, H ヘリックス以外の主鎖部分も含まれる。すなわち、ヘリックスを形成していない主鎖部分も I_1 状態で収縮していると思われる。特に、apoMb の配列の中で最も疎水性が高い E ヘリックスは、収縮ドメインに含まれている可能性が高いと考えている。

I_1 状態から I_2 状態が作られる過程と、 I_2 状態から N 状態が作られる過程は、段階的にヘリックス含量が増加する過程である。この時間領域では、A ヘリックス周辺の疎水性が変化することが報告されている^{21,22)}。そのため、これらの過程は apoMb のヘリックスが正しい三次的な接触を検索する過程ではないかと解釈できる。以上の結果をまとめると、apoMb の折り畳み経路は、最初の300 μ s 以内に起こる主鎖の大規模な収縮と、その後起こる三次的相互作用の検索過程とに分けて理解することができる。

6. 二つの蛋白質から学んだこと

我々は、時分割 SAXS 法を開発することで、cyt c と apoMb の折り畳み過程で、主鎖の収縮が起きるタイミングを決定することに成功した。得られた結果を、同時に行われた時分割 CD 測定の結果とあわせて比較することで、「二つの蛋白質に共通する性質」と「蛋白質ごとの個性」

を指摘することができる。

第一の共通点は、cyt c と apoMb はともに協同的なヘリックスの形成と主鎖の収縮を示したことである。回転半径とヘリックス含量の二次元プロット (Fig. 5) において、両蛋白質の折り畳みトラジェクトリーはほぼ対角線上を走っている。これは、ヘリックスなどの二次構造は、主鎖の収縮なしには安定化されないことを示すデータである。二次構造などの部分構造の安定性の低さは、折り畳み中間体の寿命が短いこととも関連する蛋白質の本質的な性質だと思われる。

第二の共通点は、折り畳みの初期過程では主鎖の収縮が先行することである。二次元プロットが示すように (Fig. 5)、折り畳み過程全体ではヘリックス形成と主鎖の収縮が協同しているが、折り畳みの最初の相では主鎖の収縮がヘリックス形成に対して先行している。収縮の結果としてコンパクトなドメイン構造が形成されるが、ドメイン内部には正しい折り畳み構造だけが作られるわけではない。我々の最近の結果によると、cyt c の I_1 状態では、芳香族アミノ酸周辺の三次的な接触はほとんど作られていない²³⁾。また、apoMb の収縮したドメインには A, G, H ヘリックス以外の主鎖領域も含まれている。これらの結果は、ヘリックス形成よりも先に主鎖の収縮が起きることを示唆している。すなわち、cyt c と apoMb は、疎水的凝集モデルに近い機構により折り畳むのではないかと結論できる。

第三の共通点は、折り畳みの後中間体 (I_2) として、平衡条件で観察される中間状態と同じ形状をもつ状態が観察されたことである。多くの蛋白質は、穏和な条件で部分的に変性した状態を作ることが知られている。これらは、折り畳み状態に近い二次構造含量と収縮した回転半径を持ち、モルテングロビュール状態と呼ばれることもある²⁴⁾。cyt c と apoMb について知られているモルテングロビュール状態の回転半径とヘリックス含量は^{3,25,26)}、今回観察した速度論的な中間状態 (I_2) とよく一致した (Fig. 5)。この観察は、折り畳み状態が作られる直前の段階で、共通のエネルギー障壁を持つ何らかの運動があることを示唆している。

一方で、cyt c と apoMb の違いも明らかである。特に、cyt c の初期収縮は回転半径の変化量として~35%であることに對し、apoMb の場合は~50%と大きいことや、初期収縮に伴うヘリックス構造の形成が cyt c では見られないのに対して、apoMb では30%にも達することが挙げられる。これらの違いは、分子量の大きい蛋白質ほど大規模な初期の構造形成を行う傾向を示唆している。

cyt c と apoMb は共にヘリックスを多く含む球状蛋白質であるが、前者にはヘムが含まれるなど、両者の構造はだいぶ異なっている。しかし、上で説明したようにかなり共通する折り畳み経路が観察された。これらの共通点から、我々は次の折り畳み機構を提案したい (Fig. 8)。蛋

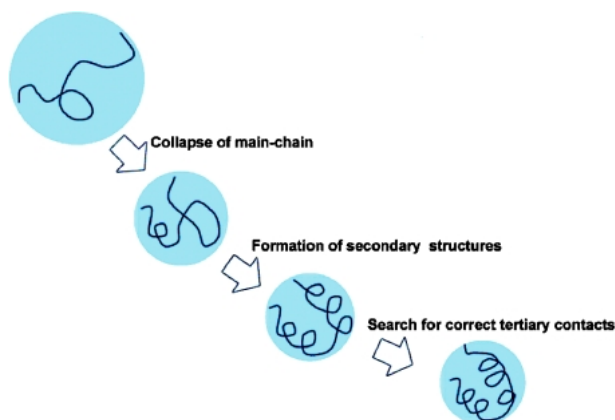


Figure 8. The proposed folding scheme for cyt *c* and apoMb.

白質は折り畳み過程の最初の相で主鎖の収縮を示す。この収縮は残基間の疎水の相互作用により引き起こされ、主鎖が持つコンフォメーションの数を劇的に減らすものの¹⁰⁾、収縮したドメイン内部に天然構造はあまり形成されない。しかし、ドメイン内部では誘電率が低下するはずである。低誘電率の溶液中においては、ポリペプチドのヘリックス形成能が上昇することが知られている²⁷⁾。そのため、初期の収縮は、主鎖が取り得るコンフォメーション数を減らすだけでなく、主鎖がヘリックス構造を作りやすい環境を作る役割も持つのではないと思われる。最後に、収縮したドメインの中で、ヘリックス同士が正しい二次的な接触を探る運動により折り畳み構造が作られる。

7. 今後の展望

我々は時分割 X 線小角散乱測定装置を開発することにより、apoMb と cyt *c* という二つの球状蛋白質の折り畳み経路を観察した。これらの蛋白質に共通する折り畳み過程を検討することから、主鎖の収縮を引き金として、二次構造と三次構造が段階的に形成する折り畳み機構を提案した。

今後の研究の展望として、初期の収縮状態をさらに様々な角度から調べる必要性を指摘したい。時間分解能の高い SAXS のデータを広角領域まで測定することで、初期収縮状態の形状をより詳しく推定できる²⁸⁾。また、我々の測定は α ヘリックスに富んだ蛋白質に限られていたが、他の二次および三次構造を持つ蛋白質についても観察を広げ、初期状態の性質と配列の疎水性度やヘリックス形成能との相関を調べることは、大変興味深い課題である。

我々の観察を、理論計算の結果と比較することも大切である。蛋白質の全原子を対象にした分子動力学計算を、折り畳み過程に適用することは難しい。これは、計算量が膨大になることに加えて、どのようなポテンシャル関数を使うべきか、などの基本的な計算手法も確立していないことが原因である。例えば、cyt *c* の折り畳み全過程を再現し

ようとした最近の二つの計算結果は、折り畳みの初期に N 末端と C 末端のヘリックスの間の接触が起こるかどうかが、という点で矛盾している^{29,30)}。この接触のタイミングを観測することは、cyt *c* についての重要な課題である。

最後に、我々が開発した時分割 SAXS 法は、蛋白質の折り畳み過程に限らず、生体高分子の関わる種々のダイナミクスの研究に応用可能であることを指摘したい。生体分子の機能は、比較的大きな構造ドメインの運動で制御される場合が多い。このような運動は、サブミリ秒からミリ秒の時間領域で起こるとされるが、従来の研究手法で捕捉することはほとんど不可能だった。時分割 SAXS 法は、生体分子の機能を理解するためのユニークで重要な手法として、今後も発達するものと期待される。

謝辞

本研究を共同ですすめていただきました森島績教授、石森浩一郎教授、木村哲就さん（京大院工）、西川幸宏博士（京都工織）にお礼を申し上げます。後藤祐児教授（阪大蛋白研）には多くの議論をいただきました。BL45XU の維持管理には前田雄一郎博士（理研播磨/SPring-8）の協力をいただきました。この研究は、科技団のさきがけ研究 21 と文科省の科研費・振興調整費により行われました。

参考文献

- 1) C. B. Anfinsen: *Science* **181**, 223 (1973).
- 2) C. Levinthal: *J. Chim. Phys.* **65**, 44 (1968).
- 3) S. Akiyama, S. Takahashi, T. Kimura, K. Ishimori, I. Morishima, Y. Nishikawa and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1329 (2002).
- 4) T. Uzawa, S. Akiyama, T. Kimura, S. Takahashi, K. Ishimori, I. Morishima and T. Fujisawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1171 (2004).
- 5) L. Pollack, M. W. Tate, N. C. Darnton, J. B. Knight, S. M. Gruner, W. A. Eaton and R. H. Austin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 10115 (1999).
- 6) C. L. Brooks III: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1099 (2002).
- 7) H. Roder: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1793 (2004).
- 8) P. S. Kim and R. L. Baldwin: *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459 (1982).
- 9) M. T. Reymond, G. Mrutha, H. J. Dyson and P. E. Wright: *Prot. Sci.* **6**, 706 (1997).
- 10) K. A. Dill, S. Bromberg, K. Yue, K. M. Fieberg, D. P. Yee, P. D. Thomas and H. S. Chan: *Prot. Sci.* **4**, 562 (1995).
- 11) M. Arai, T. Ikura, G. V. Semisotnov, H. Kihara, Y. Amemiya and K. Kuwajima: *J. Mol. Biol.* **275**, 149 (1998).
- 12) D. Eliezer, P. A. Jennings, P. E. Wright, S. Doniach, K. O. Hodgson and H. Tsuruta: *Science* **270**, 487 (1995).
- 13) S. Takahashi, S. R. Yeh, T. K. Das, C. K. Chan, D. S. Gottfried and D. L. Rousseau: *Nature Struct. Biol.* **4**, 44 (1997).
- 14) T. Fujisawa, K. Inoue, T. Oka, H. Iwamoto, T. Uruga, T. Kumasaka, Y. Inoko, N. Yagi, M. Yamamoto and T. Ueki: *J. Appl. Crystallogr.* **33**, 797 (2000).
- 15) G. W. Bushnell, G. V. Louie and G. D. Brayer: *J. Mol. Biol.* **214**, 585 (1990).
- 16) M. C. R. Shastry and H. Roder: *Nature Struct. Biol.* **5**, 385 (1998).

- 17) S. Akiyama, S. Takahashi, K. Ishimori and I. Morishima: *Nat. Struct. Biol.* **7**, 514 (2000).
- 18) D. Eliezer and P. E. Wright: *J. Mol. Biol.* **263**, 531 (1996).
- 19) F. M. Hughson, P. E. Wright and R. L. Baldwin: *Science* **249**, 1544 (1990).
- 20) P. A. Jennings and P. E. Wright: *Science* **262**, 892 (1993).
- 21) M. Jamin and R. L. Baldwin: *J. Mol. Biol.* **276**, 491 (1998).
- 22) N. Haruta and T. Kitagawa: *Biochemistry* **41**, 6595 (2002).
- 23) 屋根 晃 : 京都大学大学院工学研究科修士論文 (平成15年度).
- 24) M. Arai and K. Kuwajima: *Adv. Protein Chem.* **53**, 209 (2000).
- 25) M. Kataoka, Y. Hagihara, K. Mihara and Y. Goto: *J. Mol. Biol.* **229**, 591 (1993).
- 26) M. Kataoka, I. Nishii, T. Fujisawa, T. Ueki, F. Tokunaga and Y. Goto: *J. Mol. Biol.* **249**, 215 (1995).
- 27) C. A. Rohl, A. Chakrabartty and R. L. Baldwin: *Prot. Sci.* **5**, 2623 (1996).
- 28) D. I. Svergun and M. H. J. Koch: *Rep. Prog. Phys.* **66**, 1735 (2003).
- 29) A. Cardenas and R. Elber: *Proteins Struct. Funct. Genet.* **51**, 245 (2003).
- 30) I. Daidone, A. Amedai, D. Roccatano and A. Di Nola: *Biophys. J.* **85**, 2865 (2003).

著者紹介



高橋 聡

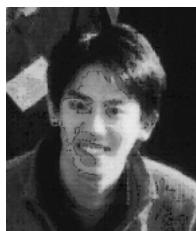
大阪大学蛋白質研究所

E-mail: st@protein.osaka-u.ac.jp

専門：生物物理学・生体分子分光学

略歴：

1992年総研大博士（理学）。分子研（岡崎），AT & T Bell Labs. (Murray Hill)，理研（和光）でのポストドクの後，96年京大院工・分子工学助手。99-02年科技団さきがけ研究員兼任。03年阪大蛋白研助教授。



鵜澤尊規

京都大学大学院工学研究科分子工学専攻

E-mail: uzawa@tak.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

専門：生物物理学・蛋白質折り畳み

略歴：

2003年京大院工・分子工学修士修了，同博士課程在学。



秋山修志

理化学研究所播磨研究所/SPring-8

E-mail: akishu@spring8.or.jp

専門：生物物理学・X線溶液散乱

略歴：

平成14年度京大博士（工学）。平成13から14年度まで日本学術振興会特別研究員，平成15年度より理研播磨研究所にて基礎科学特別研究員。



藤澤哲郎

理化学研究所播磨研究所/SPring-8

E-mail: fujisawa@spring8.or.jp

専門：生物物理学・X線小角散乱

略歴：

1989年阪大博士（工学）。Yale大（アメリカ）でのポストドクの後，90年理化学研究所・研究員。98年同前任研究員。96年よりBL45XU-SAXSの建設・維持管理に携わる。

Development of the Submillisecond-resolved Small-angle X-ray Scattering Method and Its Application on the Folding Processes of Proteins

Satoshi TAKAHASHI Institute for Protein Research, Osaka University,
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN
Takanori UZAWA Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University,
Nishikyo, Kyoto 615-8194, JAPAN
Shuji AKIYAMA RIKEN Harima Institute/SPring-8, Structural Biochemistry Laboratory,
Sayo Hyogo 679-5148, JAPAN
Tetsuro FUJISAWA RIKEN Harima Institute/SPring-8, Structural Biochemistry Laboratory,
Sayo Hyogo 679-5148, JAPAN

Abstract

Characterization of the processes of protein folding in terms of compactness and molecular shapes is important to understand how the unique native structures of proteins are selected from the ensemble of unfolded structures. The submillisecond-resolved observation system for small-angle X-ray scattering was developed and applied for the processes of cytochrome c and apomyoglobin folding. It was demonstrated that the secondary and tertiary structures of these proteins are largely organized cooperatively; however, the initial folding phase involves a significant collapse of their main chain structures. Based on these observations, a common folding mechanism was proposed, in which hydrophobic environments realized by the initial collapse prompts the subsequent formation of helical structures.