

# 高速 X 線 1 分子追跡法を使ったタンパク質のフォールディング ダイナミクスの解析

## Protein Folding Dynamics Based on High Speed Diffracted X-ray Tracking

高橋 聡<sup>a</sup>, 小井川浩之<sup>a</sup>, 関口博史<sup>b</sup>, 佐々木裕次<sup>c</sup>  
Satoshi Takahashi<sup>a</sup>, Hiroyuki Oikawa<sup>a</sup>, Hiroshi Sekiguchi<sup>b</sup>, Yuji Sasaki<sup>c</sup>

<sup>a</sup>東北大学多元物質科学研究所, <sup>b</sup>(公財)高輝度光科学研究センター,  
<sup>c</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科

<sup>a</sup>Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, <sup>b</sup>Japan Synchrotron Radiation Research Institute, <sup>c</sup>Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

タンパク質が変性状態から天然状態にフォールディングする過程の解明を目指し、プロテイン A の B ドメイン (BdpA) のゆらぎ運動を X 線 1 分子追跡法 (DXT 法) を用いて観察することを試みた。金基板に BdpA と金ナノ結晶を滴下した試料について DXT 測定を行い、多数の回折点を検出した。変性剤濃度が低い条件では回折点の揺らぎ運動は制限されており、金ナノ粒子と基板の間の相互作用が示唆された。一方で、変性剤濃度が高い条件では比較的速い運動が検出される場合があった。この条件では、変性した BdpA の鎖の揺らぎ運動を観察できた可能性がある。

**キーワード:** タンパク質のフォールディング、プロテイン A の B ドメイン、X 線 1 分子追跡法

### 背景と研究目的:

タンパク質は、ゆらいだ変性状態から折り畳まれた天然状態に自発的に折り畳まれる (フォールディングする) 高分子である。変性状態と天然状態の間で二状態的なフォールディング転移を示す小タンパク質において、変性状態と天然状態の間に存在する遷移状態を乗り越える時間 (transition path time) はどのくらいかという議論がなされている。一分子蛍光測定によりこの時間が 10 マイクロ秒以内であるとする報告がされたほか<sup>[1]</sup>、遷移状態を乗り越える過程を分子動力学計算により再現しようとした結果などが報告された<sup>[2]</sup>。本研究は、従来とは異なるアプローチを用いて transition path time を実測することを目標とし、高速 X 線 1 分子追跡法 (DXT 法) をタンパク質のフォールディング運動の解析に応用することを試みた。

DXT 法は、金ナノ結晶をタンパク質にラベル化することで、タンパク質の構造変化を金ナノ結晶の示す回折点の位置変化として計測する手法である (図 1)<sup>[3]</sup>。特に、放射光 X 線と高速カメラを用いることで、10 マイクロ秒の時間分解能での回折点の観測も可能である。測定対象としたのは、プロテイン A の B ドメイン (B domain of protein A: BdpA) である。BdpA はアミノ酸残基数が 62 残基であり、三つのヘリックスが束ねられた構造を持つ小タンパク質である。また、二状態の折り畳みを示すことが知られている。我々は、BdpA に蛍光色素をラベル化した試料について一分子蛍光観察を行うことで、天然状態や変性状態における構造揺らぎを報告した<sup>[4],[5]</sup>。本実験において、金ナノ結晶をラベルした BdpA を基板に固定して DXT 測定を行うことで、transition path time を計測するだけでなく、天然状態や変性状態におけるダイナミクスの解析が可能になると予想した。

### 実験:

BdpA の N 末端付近と C 末端付近にシステインを導入した試料 (K5C/A55C) を作製した。この試料では、二つのシステインがタンパク質の反対側に位置する。システインを還元した変異体の BdpA を金基板に滴下し、さらに金ナノ結晶を添加した試料を作製した。この操作により、金ナノ結晶が片末端にラベル化された BdpA が、反対側の末端にて金基板に固定されることを期待した。この試料に対して、異なる変性剤濃度の緩衝溶液を滴下した。変性剤濃度がゼロの溶液中では BdpA が折り畳まれた構造を保つのにに対して、グアニジン塩酸塩濃度が 3M では変性中点付近、グアニジン塩酸塩濃度が 4M の溶液では変性状態にあると期待される<sup>[5]</sup>。DXT 測定には

BL40XU を使い、X-ray Image Intensifier (V5445P, Hamamatsu photonics, Japan) を介して CMOS カメラ (SA 1.1 Photron, Japan) にて回折点を連続計測する実験を、10 マイクロ秒の時間分解能と 100 マイクロ秒の時間分解能にて行った。

結果および考察：

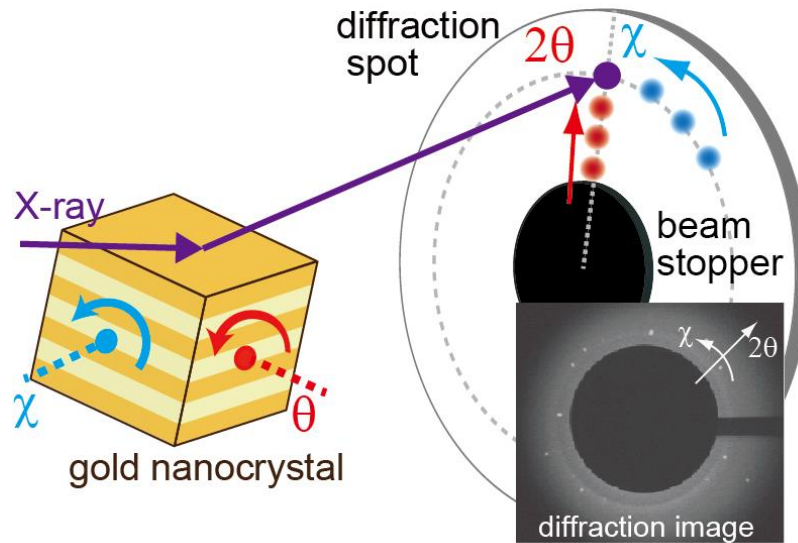


図 1. DXT 法の測定原理と回折角の定義。金ナノ結晶に入射した白色 X 線は、X 線に対する結晶の角度に応じて回折点を生じる。金ナノ粒子はタンパク質を介して基板に固定されるため、金ナノ粒子の回転運動は、タンパク質の示す揺らぎ運動を反映する。X 線の入射位置には多数の金ナノ結晶が存在するため、実際の検出イメージには多数の回折点が観察される。金ナノ粒子が入射 X 線の軸方向に回転する座標を  $\chi$  角、動径方向に回転する座標を  $\theta$  角と定義する。

10 マイクロ秒の時間分解能による DXT 測定では、回折点の運動はほとんど観察できなかった。しかし、100 マイクロ秒の時間分解能における測定では、100 マイクロ秒から数ミリ秒の時間領域において揺らぎ運動を行う多数の回折点が検出された。得られた回折点を追跡し、 $\theta$  角と  $\chi$  角の座標方向における平均二乗変位を計算した (図 1)。異なる変性剤濃度における結果の例を図 2 に示したが、データの再現性は悪く、同じ条件で計測を行っても平均二乗変位が異なる振る舞いを示す場合もあった。すなわち、本実験手順と条件による測定では、何らかの要因によりデータの再現性が悪いことが示された。

図 2 に示すデータについて、さらに以下の考察が可能である。第一に、 $\theta$  角方向については平均二乗変位が時間に対してほぼ直線的に増加したが、 $\chi$  角方向については、変動がほとんど見られないトレースが多かった。また、 $\chi$  角方向では不規則な変動を示すトレースもあった。これらの結果は、 $\theta$  角方向における金ナノ結晶の揺らぎ運動はほぼ拡散的に起きるものの、 $\chi$  角方向については揺らぎ運動が大きく制約されていることを示している。すなわち、金ナノ結晶が基板表面と直接相互作用することで固定化された状態にあることが示唆される。平均二乗変位の観測データの再現性が良くなかった原因としても、金ナノ結晶と基板との相互作用は試料ごとに異なり、制御が難しいことが挙げられる。このように、得られたデータの多くは BdpA の運動性を直接は反映していないことが示唆された。

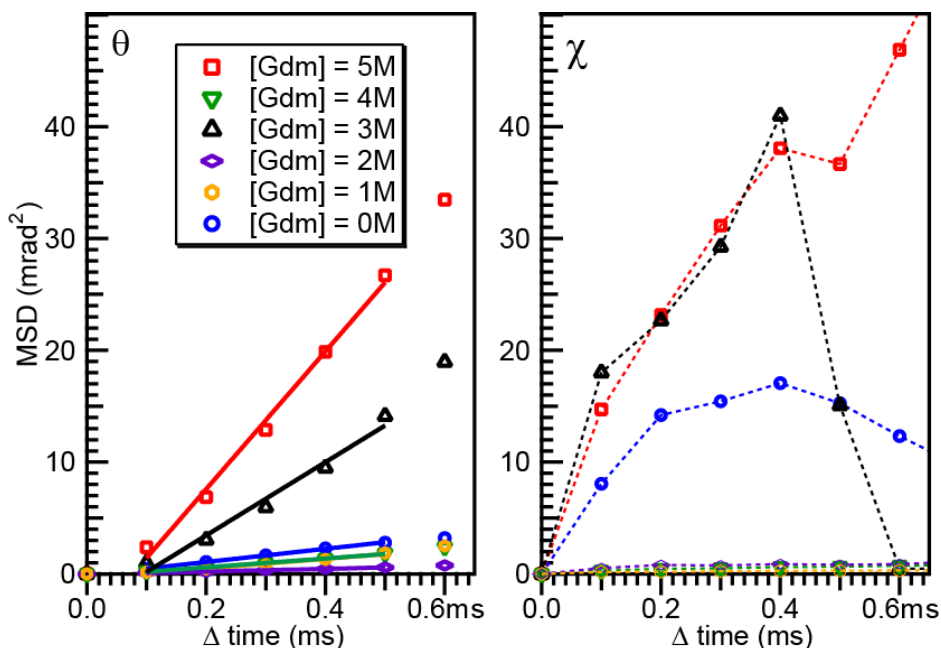


図2. 金ナノ結晶と BdpA を滴下した金基板における DXT 計測結果。グアニジン塩酸塩濃度が 0M (青丸)、1M (黄丸)、2M (紫四角)、3M (黒三角)、4M (緑三角)、5M (赤四角) において回折点の運動を多数計測し、得られた時系列データから計算した平均二乗変位 (Mean Square Displacement: MSD) をプロットした。左パネルは、 $\theta$  角方向についての運動、右パネルは  $\chi$  角方向についての運動を示した。 $\theta$  角方向における 0.1ms から 0.5ms のデータを用いて、回転拡散定数を直線フィットにより計算した。フィットした結果を直線にて示した。

第二に、変性剤濃度が 5M の溶液中において得られたデータを検討する (図2、赤)。この条件では、 $\theta$  角と  $\chi$  角の両方について平均二乗変位の時間変化が比較的大きかった。金ナノ結晶の運動性の目安として、 $\theta$  角方向における MSD プロットの時間 0.1ms から 0.5ms の範囲を直線フィットすることで回転拡散定数を算出したところ、変性剤濃度 5M の条件では  $1.54 \times 10^{-2} \text{ rad}^2/\text{s}$  であった (表1)。得られた回転拡散定数は、グループ II シャペロニンの構造変化 (ATP 非存在下にて  $1.28 \times 10^{-5} \text{ rad}^2/\text{s}$ ) や、一本鎖抗体の構造変化 (抗原非存在下にて  $2.04 \times 10^{-5} \text{ rad}^2/\text{s}$ ) について観察された値よりも明らかに大きかった [6, 7]。一方で、基板に固定せずに溶液中に分散している金ナノ粒子において観察された回転拡散定数 ( $0.28 \text{ rad}^2/\text{s}$ ) よりは劇的に小さかった [8]。以上の比較から、変性剤 5M の溶液中において観察された揺らぎ運動は、構造を持ったタンパク質よりは速いけれども、ナノ結晶単体のゆらぎ運動よりは大きく制約されていることが推定できる。すなわち、この条件においては、金基板と金ナノ結晶の間の相互作用が弱まり、両者を架橋した BdpA により制約された運動が観察されたことが示唆された。

一分子蛍光観察実験により、変性した BdpA の揺らぎ運動が 10 マイクロ秒以内の速い時間領域で起きることが示されている [9]。本研究の結果は、BdpA よりも大きな金ナノ結晶のラベル化により、揺らぎ運動が大きく減速したことを示唆するものである。

#### 今後の課題：

本研究により、BdpA のフォールディング反応を DXT 測定により解析するためには、金ナノ結晶と基板の間の相互作用を極力抑える必要があることが示された。ナノ結晶と基板との間の相互

表1.  $\theta$  角方向の回転拡散定数

[Gdm] (M)	$D$ ( $\text{rad}^2/\text{s}$ )*
0	$1.48 \times 10^{-3}$
1	$1.07 \times 10^{-3}$
2	$3.07 \times 10^{-4}$
3	$8.18 \times 10^{-3}$
4	$9.92 \times 10^{-4}$
5	$1.54 \times 10^{-2}$

\* $\theta$  角方向における 0.1ms から 0.5ms の MSD データを、 $MSD = A + 4Dt$  という式でフィットすることで、回転拡散定数  $D$  を算出した。ここで、 $A$  は切片、 $t$  は時間を表す。

作用を再現性よく抑制することは、BdpA が比較的小さいタンパク質であり、変性した場合にはひも状の高分子として振る舞うことを考えると大変難しい。表面効果の低減は、DXT 法をタンパク質のフォールディング運動の観察に用いるために解決しなければならない必須の課題である。

一方で、変性剤濃度が高い場合に、変性状態における BdpA の運動が観察された可能性が示された。ただし、この条件において、金ナノ粒子と金基板の間に複数個の BdpA が架橋されている可能性も残されている。今後、金ナノ粒子のラベル化方法と、基板への固定化方法の検討も必要である。

本研究を開始するにあたり、DXT 法を用いてフォールディング運動の transition path time を定量することを目標とした。しかし、この目標の達成は難しいことを指摘したい。DXT 法は、試料にラベルされた金ナノ結晶の回転運動を感度よく検出できるが、タンパク質のフォールディングに伴う最も大きい構造変化である N 末端と C 末端の距離変化の直接観察は難しい。そのため、タンパク質の変性状態と折り畳まれた状態の変化は、それぞれの状態における回転拡散定数の変化として検出することになる。この場合、一枚の回折像の計測の時間分解能は 100 マイクロ秒であっても、この計測を一ミリ秒以上継続して回転拡散定数の解析を行わないと、試料がある瞬間に変性状態にあるのか、天然状態にあるのかという判断ができない。従って、マイクロ秒の時間領域だとされる transition path time な回折点を DXT 法により実測するには、より小さなナノ結晶を用いてさらに高速の測定を行い、精密な時系列解析が必要となると思われる。

#### 謝辞：

BdpA 変異体を作製いただきました新井宗仁博士（東京大学大学院総合文化研究科）に感謝いたします。

#### 参考文献：

- [1] H. S. Chung, K. McHale, J. M. Louis, W. A. Eaton, *Science* **335**, 981-984 (2012).
- [2] S. Piana, K. Lindorff-Larsen, D. E. Shaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17845-17850 (2012).
- [3] Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota, M. Yanagihara, *Phys. Rev. E* **62**, 3843-3847 (2000).
- [4] H. Oikawa, Y. Suzuki, M. Saito, K. Kamagata, M. Arai, S. Takahashi, *Sci. Rep.* **3**, 2151 (2013).
- [5] H. Oikawa, K. Kamagata, M. Arai, S. Takahashi, *J. Phys. Chem. B* **119**, 6081-6091 (2015).
- [6] H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichiyangi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda, Y. C. Sasaki, *PLoS One* **8**, e64176 (2013).
- [7] Y. Sato, Y. Tanaka, S. Inaba, H. Sekiguchi, T. Maruno, Y. C. Sasaki, H. Fukada, Y. Kobayashi, T. Azuma, M. Oda, *Int. J. Biol. Macromol.* **91**, 151-157 (2016).
- [8] Y. Matsushita, H. Sekiguchi, K. Ichiyangi, N. Ohta, K. Ikezaki, Y. Goto, Y. C. Sasaki, *Sci. Rep.* **5**, 17647 (2016).
- [9] T. Otsu, K. Ishii, H. Oikawa, M. Arai, S. Takahashi, T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* **121**, 5463-5473 (2017).

©JASRI

(Received: July 12, 2017; Early edition: September 22, 2017;

Accepted: December 18, 2017; Published: January 25, 2018)