

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名: 蛋白質の折り畳み運動解明を目指した一分子観測法の確立
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者 高橋 聡 (東北大学多元物質科学研究所、教授))

主たる共同研究者

三本木 至宏 (広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授)

小松崎 民樹 (北海道大学電子科学研究所 教授)

鈴木 誠 (東北大学大学院工学研究科 教授) (平成 18 年 4 月～)

3. 研究実施概要

本研究は、1) 蛋白質が一分子レベルで折り畳まれる運動を連続観察する実験手法の開発、2) この手法により得られた一分子時系列データを解析する理論の開発、3) 蛋白質の水和環境を解析する手法の開発、などを目的として計画された。さらに、4) 開発した手法を熱安定性の異なる一連の相同蛋白質を対象に適応し結果を比較することで、水溶液中において蛋白質が自発的に折り畳まれる特性を理解すること、を目標とした。以上の目的のために、四つの研究グループにおける個別テーマを追求するとともに、全グループ参加の進捗報告会を頻繁に開催した。研究期間の後半では、グループ間の共同研究を積極的に追求した。

高橋グループは、はじめに、蛋白質試料を一分子レベルで長時間観察する新規手法を開発した。さらに、一分子データの取得をより容易にするために、反射放物面鏡を主要部品とした新規光学系を開発した。また、高時間分解能で一分子観察を可能にするラインフォーカス型共焦点顕微鏡を開発した。以上の装置を、酵母由来のシトクロム *c* や三本木グループにより提供された熱安定性の異なるシトクロム *c* の変性状態や折り畳み中間状態に適応し、変性状態における運動性を確認した。また、小松崎グループと共同し、一分子データを解析する手段を開発した。高橋グループにおける以上の努力により、水溶液中において機能する蛋白質を、一分子レベルで基板に固定化することなく長時間観察する実験が、容易な手法として定着しつつある。

三本木グループでは、生育温度の異なる7種類のシトクロム *c* を発現、精製する手法を確立するとともに、各シトクロム *c* の物理化学的、および、生化学的な特性を明らかにした。特に、SV シトクロム *c* の安定化機構の研究と、AA シトクロム *c* の特異な生合成過程の研究を進め、AA シトクロム *c* の構造を初めて明らかにした。さらに、多くの試料を高橋グループと鈴木グループに提供した。三本木グループにおける以上の努力により、ほぼ同じ構造に折り畳まれる一連の蛋白質が、熱安定性などの物理化学的な物性においても、生合成経路という生化学的な特性においても、幅広い違いを示すことが明らかとなった。

小松崎グループでは、一分子観察から得られたデータの解析と解釈の新しい手法を開発した。一分子観測法により得られるデータを解釈する際に、系を記述するモデルや方程式を設定せずに、データから構造遷移の複雑ネットワーク構造ならびに多次元自由エネルギー地形を再構成する手法を開発した。さらに、遷移の非統計性と分子記憶の関係、遷移状態概念の再考、熱揺らぎと蛋白質ダイナミクスのあいだの競合や協同性を解明し、「ダイナミクスから見た」蛋白質の構造構築原理の解明を目指した。

鈴木グループでは、蛋白質の水和環境を観察するための誘電スペクトル測定装置の開発を進め、得られたデータから蛋白質の水和環境を推定する解析手法を開発した。これにより、天然状態から変性状態に至る蛋白質の水和状態の定量的評価法の確立を目指した。開発した方法を三本木グループから提供されたシトクロム *c* の水和状態解析に応用し、高橋グループで実施する折り畳み運動の特性評価や三本木グループの研究成果と合わせて総合的に考察した。

以上の研究テーマの追求の他に、生物物理学会年会 (福岡、2008 年) における国際シンポジウムを、JST 戦略的創造研究推進事業国際強化支援策のサポートにより開催するなど、構成メンバーが複数の国際シンポジウムを積極的に企画した。また、John Wiley & Sons 社より、*Advances in Chemical Physics* 誌の特集号「Single Molecule Biophysics: Experiments and Theories」を共編出版 (2010 年出版予定) するなど、研究成果の普及と成果を基にした国際的な研究者コミュニティの構築を行った。

本研究の直接の成果は、発表論文数や論文の質、学会発表などに反映されている。また、数字には表れにくい成果は、一分子時系列データと水和情報を基にした蛋白質のダイナミクス解明が、新しい研究の潮流として研究分野に認識されはじめていることに表れている。本研究期間の終了後も、これまでに確立した学問的基盤

と国内外にわたる研究者ネットワークを活かし、研究を発展させる基盤ができた。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

タンパク質が一分子レベルで折り畳まれる運動を連続観察する実験手法の開発を中心に、多面的にタンパク質の折り畳み機構を通して生命現象解明の手法の開発が行われた。個々のタンパク質分子を長時間にわたって観察できる装置の開発、一分子時系列データを解析する理論の開発、そして熱安定性の異なる一連の相同タンパク質試料の提供とそれを対象に結果を比較することで、水溶液中においてタンパク質が自発的に折り畳まれる特性を理解することを目指した。さらにタンパク質の水和環境についての研究を関連づけるため、新たにグループを加えることにより、研究の幅が広がった。研究チームは各グループの課題を追求すると同時に、連携して総合的に研究計画の達成を進めた。

長時間溶液中の1分子観察用の反射光学系の開発、1分子観察可能なラインフォーカス型共焦点顕微鏡の開発は、これまでの計測系では実現不可能な計測を世界に先駆け可能にしたもので高く評価される。また1分子時系列データの解析法の開発では、あくまでも計測データから出発するというユニークな立場を貫き、世界に通用する成果を上げることができた。

原著論文 36 報、総説等 17 報、国内外の招待講演 79 件、口頭発表 93 件、ポスター発表 126 件、受賞 4 件、マスコミ報道 5 件等、外部発表のレベルは極めて高く評価できる。一方、開発した顕微鏡の製品化も予定されている。また、一中小企業の角形石英キャピラリーの作成など、1分子観測法の確立はノウハウの財産であることを実証した。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

開発された装置と計測技術については、国内外に同等なレベルでの類似研究はなく、また計測・分析基盤技術のアイデアとして秀逸であり、この手法がタンパク質の折り畳みに限らず、一般的な生体分子のダイナミクスの問題に応用可能であることを考えた時、科学的・技術的インパクトは高い。実際、開発した装置はほぼ製品化にまで至っている。この装置の有用性の高さを示すものである。一方、開発した一分子時系列データの解析手法は様々の計測データに応用され、需要は増えている。

筋書き通りに展開してきていたし、問題点も予想通りであった印象もある。また、生命現象の解明に相当するフォールディングの理解は、この研究開発では難しいという見解もある。しかし、この難問から逃げることなくグループ間の連携で1分子の基礎学の確立に挑んだ意義はあるし、このような挑戦的基盤技術研究も支援するのが CREST の意義である。若いグループであり、今回の CREST 研究で得たものを糧に今後の展開が楽しみである。

国際シンポジウムなどの機会を積極的に設け、国内外の研究グループへ成果の紹介や交流を図り、新しい研究の潮流を生み出す努力を重ねている。このようにして生み出された研究基盤やネットワークとリンクしながら今後研究が発展してゆくことが期待される。

4-3. 総合的評価

水溶液中において機能する蛋白質を、一分子レベルで基板に固定化することなく長時間観察する実験手法を

確立した。この技術は多く計測に応用されることが予想され、この装置を通して、研究の輪が広がることが期待できる。また、技術開発はこれからも続けられるだろう。1分子計測のよりクリアなデータをもって、グループ間の具体的な連携が将来にわたって実現されることを願っている。

複雑なタンパク質の折り畳みのメカニズムの解明に、さらなる研究の進展を期待したい。生命現象の解明という目標をあくまでも忘れずに研究を進めれば、大きな成果に結びつくものと期待したい。