

1.研究課題名 構造トポロジーを用いた細胞内蛋白質の生涯プログラム

2.研究者氏名 高田 彰二

グループメンバー 高城 史子 (研究期間 H12.11.1. ~ H15.7.31.)

3.研究の狙い：

生体内でのタンパク質の生涯は一定の過程をたどるようにプログラムされている。主な過程に、1)単一タンパク質の折りたたみによる構造形成、2)ストレス構造変性からのシャペロンによる修復、3)調節機能としてのタンパク質分解、などがある。これらは、細胞内タンパク質に“プログラムされた生涯”であるのに対し、4)アルツハイマー病などの脳疾患の際、タンパク質の 転移を引き金としておこるアミロイド形成、などはそのプログラムのエラーと考えられる。そこで本研究の狙いは、この細胞内タンパク質の生涯プログラム (とそのエラー)を、タンパク質の“立体構造トポロジー”(=粗視化した3次構造、またはフォールド)を軸に、総合的に捉えることである。

“立体構造トポロジー”の役割は最近注目を集めている。例えば、“単一タンパク質の折りたたみ機構は概ねそのトポロジーで決まる”という概念が定着した。また、“シャペロンの基質タンパク質には / トポロジーが多い”ことが発見された。アルツハイマーやプリオン病に関連のあるアミロイド形成は、 の転移によって引き起こされる。

このような状況を鑑み本研究では、具体的に次の3つの狙いを設定する。

1. 単一タンパク質の折りたたみについて、トポロジーと折りたたみ困難さとの関係を物理化学的に明らかにし、それを基に折りたたみ経路と立体構造の理論的予測法を確立する。
2. 分子シャペロン (大腸菌 GroEL)内のタンパク質折りたたみ機構の物理化学的解明。特に、シャペロンを必要とするタンパク質とそのトポロジーの関係を明らかにする。
3. 加齢とともに発症率が高まるアルツハイマー病の原因と考えられている、シートタンパク質の沈着機構の解明。最初に沈着の引き金になる 型トポロジー転移現象、生成し始めたアミロイドの成長機構、などを理論的に基礎付け、それらを制御できる条件を検討する。

4.研究結果：

(1)単一タンパク質の折りたたみ：

折りたたみ機構の物理化学的説明についての研究と、それに基づいてタンパク質立体構造予測を行う方法の確立との両面から研究を行った。

前者については、実験的に2状態転移をすることが知られている18個の小型蛋白質に (SH3, Cl2, protein G, protein L, リプレッサーなど)について、トポロジー情報のみを使ったモデルによってシミュレーションを行い、トポロジーと折りたたみ機構との関係について以下二点をあきらかにした。1)折りたたみ速度定数 k_f はトポロジーと鎖の長さで概ね決まり、スケーリング則、 $\ln k_f \sim -a RCO \times N^{2/3}$ と書ける。ここで、RCO は Baker らの定義した、蛋白質のトポロジー情報を表す相対コンタクトオーダーである。このスケーリング則は、Baker らの発見したルールと Wolynes らによる折りたたみ速度の長さ依存性とを統一したものであり、折りたたみ反応機構の理解を大きく進めるものである。2)折りたたみ経路は、トポロジーと配列の両方がそれぞれ重要な役割を果たしていることが明らかになった。計算したタンパク質の約半分では、計算による折りたたみ経路は実験結果とよく一致を示したものの、残り半分については有意な相違が見られた。以上の内容は、

学術論文として、J Mol Biol に掲載された。

また、アミノ酸配列情報からのタンパク質立体構造予測法の確立に向けて、数多くの新しい方法、アルゴリズムの開発を行った。特記すべきは、1) シートに特徴的な水素結合の相関を取り込んだ関数によりシートの安定性を決定的に向上させることに成功した点、2)数多くのパラメータを学習理論に基づいて最適化することができた点、および 3)既知構造タンパク質のフラグメントを組み合わせるBaker流の方法を我々のプログラムに導入し、さらに独自のマルチカノニカルアンサンブル法を開発して高速構造探索を可能にした点が挙げられる。これらの開発の結果、70残基程度の短いタンパク質では、そのフォールトを予測することがかなりの程度可能になってきた。2002年には、いわゆる構造予測コンテストに参加した。既知構造テンプレートを使わない New Foldの部門において、参加約150チーム中、16位の成績であった(Russell 2003)。小さいタンパク質では、好成績であったが、大きなタンパク質ではまだ計算速度の遅さがネックになってよい結果を出せなかった。またいくつか作戦間違いをしてしまった点で悔いが残る。力を出し切っていれば全体としては、もうすこしうまくやれたはずだと思う。(ただしこれは、敗者の言い訳でもある)それでも我々のグループ、日本からこの部門に主参加したチーム中では最高位である。これらの内容は、学術雑誌 J Chem Phys, Proteins などに掲載された。

②)分子シャペロン：

最近、実験的に、シャペロニンの空洞内に入るだけで、基質タンパク質の折りたたみが加速されるというデータが Hartl たちによって報告された。これを受けて、高城を中心に、理論的観点から、空洞内に閉じ込められたタンパク質の物性、とくに折りたたみなど、を徹底的に調べることにした。その結果、1)タンパク質は、普遍的に、シャペロン様の空洞に閉じ込められることで熱的に安定化すること、2)その安定化は、大きなタンパク質ほど大きいこと、3)折りたたみは、ある程度大きなタンパク質では加速される一方、非常に大きすぎると逆に遅くなってしまうこと、などを明らかにした。これらの結果は論文にまとめ、学術誌 PNAS に発表した。

GroEL+GroES の構造変化とそれによる基質タンパク質の構造修復の分子シミュレーションはまだ進行中である。GroEL は、ATP および GroES と結合することで大きな構造変化を起こす。その様子を分子動力学シミュレーションで再現した。現在なお、この中に基質を導入し、シャペロン内での基質タンパク質構造修復を調べている。多少の拡張、修正の後、これらの系の分子シミュレーション結果をまとめられる見込みである(Takagi & Takada unpublished)。

③)アミロイド形成：

アミロイド形成過程の理論研究をする際、関係する膨大な数のタンパク質をいかに取り扱うかが大きな問題である。金城を中心に取り組んだ、密度汎関数理論を用いたタンパク質高濃度溶液の理論化に成功し、それによってまず細胞内における構造安定性および凝集についての巨大分子混み合いの静的、および動的過程の研究を行った。

さらに、それに分子シャペロンの効果も加えることに成功した。分子シャペロンが存在すると期待されるように、凝集は抑制される。その際、高分子混み合いは、1)凝集を促進する効果と、2)分子シャペロンのタンパク質への結合を促進し、それによって結果的に凝集を抑制する効果とが競合する可能性を明らかにした。この結果は、Biophys J.などに掲載された。

5.自己評価：

タンパク質の折りたたみ、構造予測については、3年前はごく簡単なヘリックスタンパク質のみで成功していた。この3年で1) シート型水素結合対の相関と2)フラグメント組み合わせ法による

高速探索との 2 つの大きな展開があり、かなりの小型タンパク質 (アミノ酸 60 残基程度) ではトポロジーを正解できるところまで来た。これは大きな前進だと思う。予測の確度、精度がまだ不十分である点、及び大きなタンパク質ではまだ構造が探索しきれない点が大いに不満である。2002 年の国際構造予測コンテストCASP5 では、大きなタンパク質で軒並み作戦が失敗し、残念ながら目指したほどの上位には到達できなかった点に「大いに悔いが残る。

分子シャペロンによるタンパク質の構造修復については、「かご閉じ込め効果」に関して、先駆的な Hartl らの実験を理論的にサポートする結果を出し、シャペロニンの役割についての新しい流れを作るのに貢献したと思う。さらに推し進めて、シャペロニンの構造変化まで含めて、基質タンパク質がどのようにかごの中に取り込まれるのかを明らかにするシミュレーションを計画、実行してきたが、予想以上に時間を要しておりまだ研究途中である。

アミロイド形成については、タンパク質高濃度溶液に対する新しい理論体系を定式化し、一般的な凝集や折りたたみの問題を扱えた点は意義があると思う。さらに推し進めて、タンパク質の異方性をとりこみアミロイド繊維などの高次の構造体形成を理論化したかったが、時間的制約などの問題で形になるところまで行かなかった。

総体的には、それぞれのサブテーマごとに、ワンステップの進歩が見られ点は良かったと思う。3 年間という期間は思った以上に短く、本来目指していたその先のレベルの研究は、期間中に形にすることが出来ず、残念である。

6. 研究総括の見解：

本研究領域で唯一の、タンパク質構造生物学研究者である。その利点を活かして、他の研究者に大きな影響を与えるとともに、当研究者自身も生物・医学領域の他研究者から多大な影響を受け、変身を遂げつつあることは注目してよい。今後のユニークな成長を期待し得る本研究領域が産んだ逸材である。

7. 主な論文等：

1. N Koga and S Takada, Roles of native topology and chain length scaling in protein folding: Simulation study with Go-like model, J Mol Biol, 313,171-180(2001)
2. G Chikenji, Y Fujitsuka and S Takada, A reversible fragment assembly method for de novo protein structure prediction, J Chem Phys, 119, 6895-6903 (2003)
3. W Jin, O Kambara, H Sasakawa, A Tamura, and S Takada, De novo design of foldable proteins with smooth folding funnel: Automated negative design and experimental verification, Structure, 11, 581-590 (2003)
4. F Takagi, N Koga and S Takada, How protein thermodynamics and folding mechanisms are altered by the chaperonin cage: Molecular simulations, PNAS, 100, 11367-11372 (2003)
5. AR Kinjo and S Takada, Competition between Protein Folding and Aggregation with Molecular Chaperones in Crowded Solutions: Insight from Mesoscopic Simulations, Biophys J 85, 3521-3531 (2003)

(上記を含め査読付き専門雑誌の論文 14 報、日本語総説 4 報)

(学会発表 国際学会 11 件、国内学会 52 件)