

湿潤シリカゲルを用いたタンパク質のフォールディング初期段階の研究

A comprehensive study of early stage of protein folding in wet silica gel

11D5603 岡部隆宏 指導教員 池口雅道

SYNOPSIS

Many studies have shown that important structural changes such as chain collapse and formation of secondary structure, leading to partially folded intermediates, occur during the early folding stage. Therefore, direct observation of these early folding events is crucial in understanding the folding mechanism. However, it is difficult to resolve them because they usually manifest themselves as an unresolvable signal change in conventional mixing experiments (burst phase). Previously, it has been reported that the folding speed is significantly decreased by entrapping proteins within wet silica gels, while the entrapped proteins retain their properties in solution. This study focused on the early folding events in wet silica gels. Five small globular proteins, horse heart cytochrome *c*, equine β -lactoglobulin, human tear lipocalin, bovine α -lactalbumin and hen egg lysozyme, were entrapped, and their secondary structure formation during early folding stage were monitored by far-UV circular dichroism. For all proteins used here, it was shown that the folding speed is significantly reduced, allowing direct observation of the process from the unfolded state to the initial intermediate state, which corresponds to the burst phase in solution experiments. Furthermore, the rates of the initial intermediate formation showed a temperature dependence, indicating that these initial intermediates are separated from the unfolded states by an energy barrier.

Keywords: protein folding, burst-phase intermediate, silica gel entrapment, cytochrome *c*, β -lactoglobulin, tear lipocalin, α -lactalbumin, lysozyme, folding energy barrier

1. 緒言

タンパク質は、DNA の情報によって決定されたアミノ酸配列をもつポリペプチド鎖としてリボソーム上で合成される。個々のタンパク質が機能を発揮するためには特有のコンホメーションへと折りたたまれる必要がある。このフォールディング反応が *in vitro* で自発的に進行することが Anfinsen の研究によって示されており、タンパク質の天然構造が特有のアミノ酸配列によって最小エネルギー構造として決定されていることは明らかである。¹しかし、ポリペプチド鎖がとりうる無数の構造の中からいかにしてわずかな時間内に特定の構造へと到達するのかを理解することは約 50 年間にわたり生物学、物理学にわたる重要な問題の一つである。一般的にフォールディング反応は階層的な反応であるが、多くのタンパク質で主要な構造変化がその初期段階で起こっていることが報告されている。したがってフォールディング反応のメカニズムの解明のために、これまでに様々なタンパク質の初期中間体の構造や安定化機構について研究が行われている。²⁻⁴

ストップフロー法は様々なフォールディング条件の実現や様々な検出機器との組み合わせが可能でありフォールディング実験に最も広く用いられてきた手法である。しかし、ストップフロー法には一般的に数ミリ秒の不感時間が伴い、それ以下の時間域に起こる反応を検出することができない。これまでに多くタンパク質でストップフロー装置の不感時間内に初期フォールディング中間体の蓄積が起こることが報告されている。したがって、これらの中間体の形成の速度過程やさらに速い段階のフォールディング反応についての情報を得るためにさらに高い時間分解能を備えた実験手法が求められる。近年ではレーザー温度ジャンプ法や光化学トリガー法などの適用によってミリ秒以下の時間域の観測も可能になっているが、これ

らの方法は実験条件や検出手法などの制限があり、幅広いタンパク質に応用することはできない。

より詳細なフォールディング初期反応に関する描像を得るための一つのアプローチとして、タンパク質分子の構造変化の速度を遅くして観測するという手法が考えられる。これまでに多くのタンパク質が溶液中と同様の構造、機能を保持したまま湿潤シリカゲル中に封入することができ、ゲルマトリックスの及ぼす影響によりタンパク質分子のグローバルな構造変化の速度が大幅に減速することが報告されている。⁵柴山による研究では、シリカゲルに封入したタンパク質のフォールディング速度が大幅に減速し、溶液中では数ミリ秒以内に起こる反応を数秒のスケールで追跡することに成功している。^{6,7}本研究ではフォールディング初期段階のキネティクスに関する知見を得るために、フォールディング反応の開始数ミリ秒以内に中間体が蓄積することが知られているウマ β ラクトグロブリン(ELG)、ウシ α ラクトアルブミン(BLA)、ニワトリ卵白リゾチーム(LYZ)、ウマ心臓シトクロム c (CYT)、ヒト涙リポカリン(HTL) の 5 種類のタンパク質を湿潤シリカゲルに封入し、それら初期中間体の形成過程を遠紫外領域の円二色性(CD)を用いて測定した。

2. 湿潤シリカゲルへのタンパク質の封入

本研究では標準的なゾル・ゲル法を一部改良した方法を用いてタンパク質分子をシリカゲル中へ封じ込めた。改良をほどこした理由は、標準的なゾル・ゲル法では BLA、HTL の場合、ゲルの合成過程で発生する高濃度のメタノールによって変性してしまい天然構造を保ったまま封入できないという問題が生じたためである。改良点として、発生するメタノールの濃度を下げるためにゲル中での水の割合を多くした。以下に、本研究で用いたゲルへのタンパ

ク質の封入の手順を示す。

まず、シリカゲルの前駆物質であるオルトケイ酸メチル ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) 1ml に水 1ml を加え、氷中で 2 分間静置した。さらに 0.1M HCl を酸触媒として 20 μl 加え、すぐに 4°C で 40 分間ソニケーション処理を行った。この段階で水はメチル基の加水分解反応に使われ、メタノールが離脱しシラノール基 (SiOH) が生成する。さらに一部のシラノール基同士で縮合反応が起こり流動性のあるゾルが生成する。このゾルは 4 °C 以下に保っておけば一週間程度保存することができる。次に生成したゾルにタンパク質溶液 (0.2M リン酸カリウム, pH7.1、25°C) を体積比 2:3 で加え、すばやく混合液 75 μl を縦 40mm×横 10mm×深さ 0.1mm 石英セルの上に移し、テフロンシートをかぶせて均一に 0.1mm なるように薄くのばした。ゾルは pH と温度の上昇に伴いさらに縮合し、室温で 1 分間以内にゲル化する。さらに縮合反応を進行させるため ELG、BLA、HTL は 2 時間、LYZ は 6 時間、CYT は 10 時間、さらに 25°C で静置した。ゲルの重合度によってタンパク質のフォールディング速度を調節することができるため、これらの時間は観測に適した速度になるように選択した。縮合反応を止めるためにテフロンシートをゆっくりと取り外し、ゲルが張り付いたセルを過剰量の水に浸した。作製した試料は透明で紫外光吸収、CD 測定が可能であった。

次に封入したタンパク質のコンホメーションを調べるために、試料の遠紫外 CD スペクトルを測定した。5 種類すべてのタンパク質のスペクトルは対応する溶液中のスペクトルとの一致がみられた。このことからゲル中に溶液中と同様の天然構造を保ったまま封入できることが確認できた。また、ゲルマトリックスによってコンホメーション変化が制限されていないことを確認するため、それぞれの試料を以降のフォールディング実験で用いた変性溶液に浸し、ゲルに封入されたタンパク質の変性を行った。湿潤シリカゲルは多孔性であるため水などの低分子を透過することができ、緩衝液に浸けることですばやくゲル内部の緩衝液置換を起こすことができる。変性は 5 分以内に完了し、測定した CD スペクトルは対応する溶液中のスペクトルとの一致がみられ、溶液中と同様にアンフォールディングすることがわかった。

3. シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング反応

本研究で用いた改良が、標準的な方法で得られたシリカゲル中で観測されるフォールディング反応と異なる結果をもたらさないかを確かめるために、まず CYT のフォールディング実験を行い、以前に柴山によって得られた CYT の結果と比較した。⁷ CYT のフォールディング反応は以前と同様に、まず試料を pH1.8 の溶液で酸変性させ、pH4.5 の溶液に浸けることで誘起した。図 1(a) にゲル中での CYT のフォールディング反応における遠紫外 CD スペクトルの変化を示した。同条件の溶液中ではフォールディング反応が 100 秒程度で完了するのに対し、ゲル中ではスペクトルが非常に長い時間をかけて天然状態のスペクトルへと近づいていくことが観測された。このことから本研究で用いたシリカゲル中でもフォールディング反応は大幅に減速することが示された。さらに、3 分後のスペクトルが以前の研究で観測されているゲル中での初期中間体のものとよく似ていた。この中間体は、溶液中ではサブミリ秒の時間領域で蓄積する中間体と等価であることが示されている。

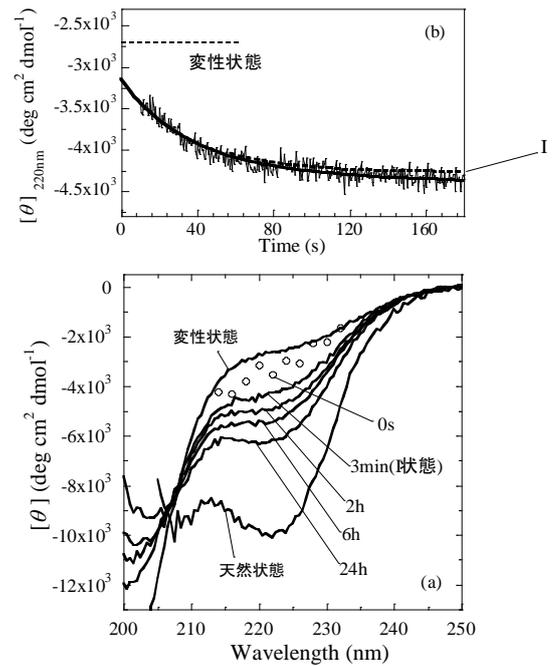


図 1 CYT の遠紫外 CD の変化

次に、フォールディング反応開始から 3 分までの CD 強度の変化を追跡した結果、単一の指数関数で表される速度過程で初期中間体 (I 状態) が形成されることがわかった (図 1(b))。これらの結果は、以前の結果とよく一致している。また、以前に観測された不感時間内に起こる CD 強度の変化も同様に観測された。この変化は、変性状態における His18 のヘムへの配位によることが明らかにされている。以上より、本研究で用いた改良がシリカゲル中でのフォールディング反応に新たな影響をもたらさないことが示された。

続いて、ELG、HTL、BLA、LYZ のフォールディング実験を行った。これらのタンパク質のフォールディング反応はグアニジン塩酸塩 (GdnHCl) 濃度を 6M から 0M ヘジヤンさせることで誘起した。反応開始 3 分以降の遠紫外 CD スペクトルの変化を観測した結果、すべてのタンパク質でスペクトルが非常に長い時間をかけて天然状態のスペクトルへと近づいていくことが観測された (図 2~5 (a))。また、フォールディング反応開始から 3 分までの CD 強度の変化を追跡した結果、単一の指数関数で表される速度過程で初期中間体 (I 状態) が形成されることがわかった (図 2~5 (b))。

ELG は天然状態で β 構造を主に持つにもかかわらず、酸変性状態 (A 状態) で非天然の α ヘリックスを形成することが知られている。⁸ また、その中間体はストップフローを用いたフォールディング実験で不感時間内に蓄積する中間体 (burst-phase 中間体) と等価であることが知られている。⁹

図 2(a) にゲル中での ELG のフォールディング反応における遠紫外 CD スペクトルの変化を示した。ELG の I 状態の CD 強度は天然状態のものよりも大きく、スペクトルの形状から非天然の α ヘリックスが形成されていることが示された。また、I 状態のスペクトルはゲル中での A 状態のものとも一致した。さらにこれらのスペクトルは溶液中で観測される burst-phase 中間体および A 状態のものともよく似ていた。これらのことから、ELG の I 状態は溶液中の burst-phase 中間体に対応する中間体であると考えられる。

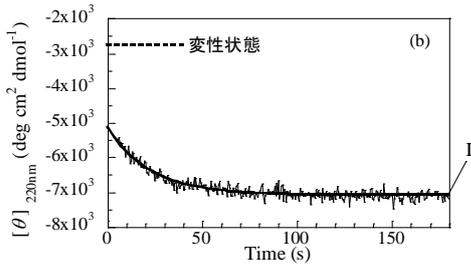
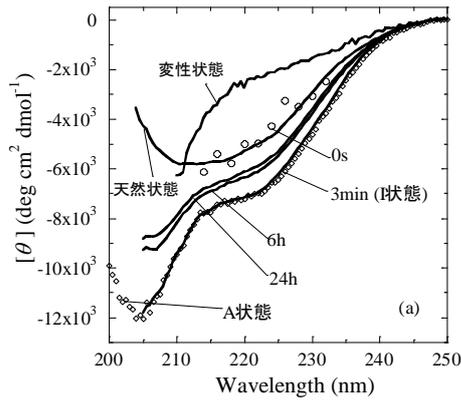


図2 ELGの遠紫外CDの変化

図3(a)にゲル中でのHTLのフォールディング反応における遠紫外CDの変化を示した。HTLはELGと相同なタンパク質で、天然状態でELGとよく似た構造を持つにも関わらず、溶液中のフォールディング実験で観測されるburst-phase中間体は非天然の α ヘリックスを形成しないことが知られている。¹⁰また、burst-phase中間体のCDスペクトルから、部分的に天然様の β 構造を持っていることが示唆されている。

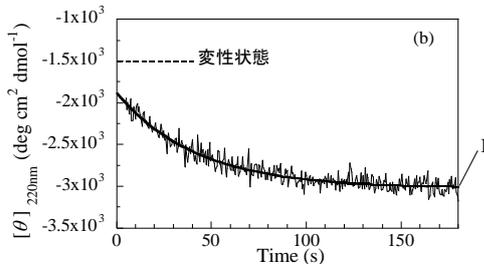
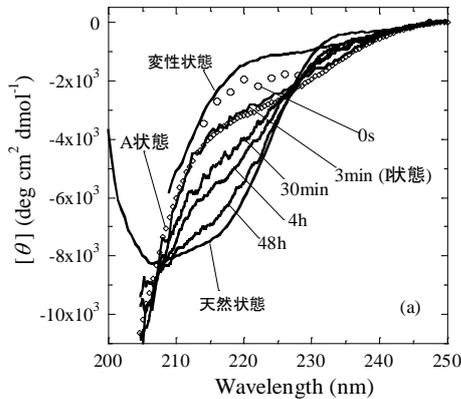


図3 HTLの遠紫外CDの変化

HTLのI状態のスペクトルは以前に溶液中で観測されたburst-phase中間体と異なる形状を示し、興味深いことにゲ

ル中でのA状態のものと一致した。溶液中ではA状態と一致するスペクトルをもつ中間体はみられていない。一般に β 構造の形成は α ヘリックスに比べて遅いため、ゲル中で観測されたI状態は溶液中でのburst-phase中間体よりもさらに速い段階のA状態と等価なフォールディング中間体である可能性が考えられる。

図4(a)にゲル中でのBLAのフォールディング反応における遠紫外CDスペクトルの変化を示した。溶液中のフォールディング実験で観測されるBLAのburst-phase中間体はA状態と等価な中間体であることが知られている。^{11,12}同様にBLAのI状態のスペクトルはゲル中で観測されたA状態のスペクトルと一致した。さらにこれらのスペクトルは以前に溶液中で観測されたburst-phase中間体およびA状態のものとよく似ていた。これらのことから、BLAのI状態は溶液中のburst-phase中間体に対応する中間体であると考えられる。

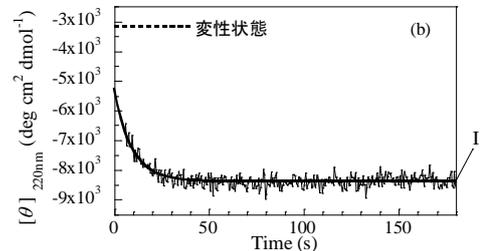
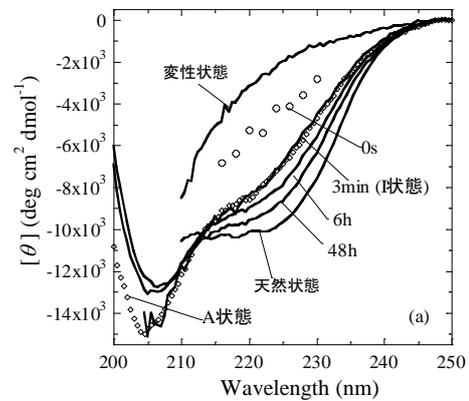


図4 BLAの遠紫外CDの変化

図5(a)にゲル中でのLYZのフォールディング反応における遠紫外CDスペクトルの変化を示した。LYZのI状態のスペクトルは以前に溶液中で観測されたburst-phase中間体のものとよく似ていた。したがって、LYZのI状態は溶液中のburst-phase中間体に対応する中間体であると考えられる。

さらに、すべてのタンパク質で不感時間内にCD強度の変化が見られた(図2-5)。これらのスペクトルのCD強度は、それぞれのタンパク質で予想される、変性剤非存在下における変性状態のものとよく一致することがわかった。一般的に変性状態はさまざまなコンホメーションのアンサンブルであり、それらは温度や、変性剤濃度によって変化すると考えられている。したがって、今回観測された不感時間内の反応は変性剤濃度の低下に伴う変性状態のアンサンブルの変化だと考えられる。

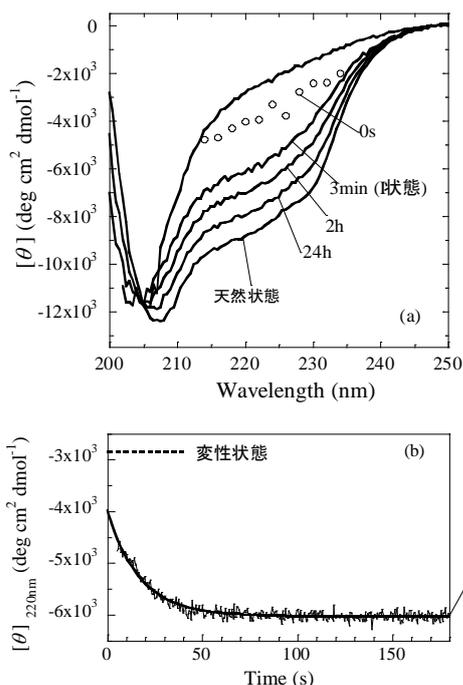


図5 LYZの遠紫外CDの変化

4. フォールディング初期段階の活性化エネルギー

ゲル中ではフォールディング反応の速度が大幅に遅くなり、従来の方法ではとらえることができなかった変性状態から初期中間体への過程をとらえることができた。また、それらは単一の指数関数で表されたことから、これらの状態はエネルギー障壁によって隔てられていることが示唆された。そこで、さらにエネルギー障壁について定量的な知見を得るために、初期反応速度の温度依存性を5~25°Cの間で観測し、アレニウス・プロットを用いて解析した(表1)。その結果、すべてのタンパク質で15~31 kJ/molの活性化エネルギーが存在することが明らかになった。これらの値は、以前にCYTについて報告されている溶液中での対応する初期反応の活性化エネルギー 約30 kJ/molの値に近い。¹³ また、これらの活性化エネルギーがタンパク質とゲルとの間の相互作用を反映していることが考えられたため、重合度を増したゲルを用いてCYTの初期反応速度の温度依存性を調べた。その結果、全体的な反応速度は遅くなったにも関わらず、それらの算出された活性化エネルギーに大きな変化は見られなかった。このことから、ゲル中で観測された活性化エネルギーはタンパク質分子内での相互作用形成に起因していることが示唆された。

表1 各タンパク質の初期反応における活性化エネルギー

タンパク質	活性化エネルギー(kJ mol ⁻¹)
ELG	16.8 ± 2.1
HTL	17.0 ± 4.6
BLA	30.6 ± 5.2
LYZ	20.8 ± 7.3
CYT	14.4 ± 6.9 ^a , 15.0 ± 3.1 ^b

^a 6時間縮合反応を行ったゲル中での活性化エネルギー

^b 48時間縮合反応を行ったゲル中での活性化エネルギー

5. 考察

以上の結果より、シリカゲルに封入することで5種類すべてのタンパク質のフォールディング速度を大幅に遅くできることがわかった。また、シリカゲル中で3分以内に蓄積した中間体は溶液中のフォールディング実験では不感時間内に蓄積する中間体であることが示唆された。このことは、シリカゲル中でのフォールディング実験が初期段階の反応の研究に有用であることを示している。しかし、ゲル中においてフォールディング反応を含む、タンパク質分子のグローバルな構造変化がどのような影響を受けて大幅に減速するのかについてはいまだにわかっていない。本研究ではゲルの重合度を変えた試料でフォールディング初期反応の活性化エネルギーを求めたが、それらの変化はみられなかった。このことは、フォールディング速度の減速が、主にエントロピーの寄与によるものであることを示唆している。現在までに、ゲル中での水分子の動きが溶液中に比べ制限されているためエントロピーの駆動力が下がりタンパク質の構造変化を遅くしているという研究が報告されている。¹⁴

今後、シリカゲル中におけるフォールディング反応を高い空間分解能を備えた検出法によって測定することで、フォールディング初期段階についてのより詳細な描像が得られると期待される。また、シミュレーションなどの理論的研究と併合すれば、これらの研究にフォールディング初期段階に関する実験的な根拠を与えると期待される。

参考文献

- Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30 (1973).
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* 59, 631-60 (1990).
- Arai, M. & Kuwajima, K. Role of the molten globule state in protein folding. *Adv Protein Chem* 53, 209-82 (2000).
- Tsytlonok, M. & Itzhaki, L.S. The how's and why's of protein folding intermediates. *Arch Biochem Biophys* 531, 14-23 (2013).
- Ellerby, L.M. et al. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. *Science* 255, 1113-5 (1992).
- Shibayama, N. Circular dichroism study on the early folding events of beta-lactoglobulin entrapped in wet silica gels. *FEBS Lett* 582, 2668-72 (2008).
- Shibayama, N. Slow motion analysis of protein folding intermediates within wet silica gels. *Biochemistry* 47, 5784-94 (2008).
- Ikeguchi, M., Kato, S., Shimizu, A. & Sugai, S. Molten globule state of equine beta-lactoglobulin. *Proteins* 27, 567-75 (1997).
- Fujiwara, K. et al. Folding-unfolding equilibrium and kinetics of equine beta-lactoglobulin: equivalence between the equilibrium molten globule state and a burst-phase folding intermediate. *Biochemistry* 38, 4455-63 (1999).
- Tsukamoto, S. et al. Non-native alpha-helix formation is not necessary for folding of lipocalin: comparison of burst-phase folding between tear lipocalin and beta-lactoglobulin. *Proteins* 76, 226-36 (2009).
- Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M. & Sugai, S. Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 24, 874-81 (1985).
- Ikeguchi, M., Kuwajima, K., Mitani, M. & Sugai, S. Evidence for identity between the equilibrium unfolding intermediate and a transient folding intermediate: a comparative study of the folding reactions of alpha-lactalbumin and lysozyme. *Biochemistry* 25, 6965-72 (1986).
- Shastry, M.C. & Roder, H. Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale. *Nat Struct Biol* 5, 385-92 (1998).
- Eggers, D.K. & Valentine, J.S. Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins. *J Mol Biol* 314, 911-22 (2001).