

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

2014年9月

岡部 隆宏

目次

1 章 緒言	4
1.1. Levinthal パラドックス.....	4
1.2. モルテングロビュール状態	6
1.3. フォールディング初期段階の研究	7
1.4. シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング反応	8
1.5. 本研究の目的	9
2 章 溶液中とシリカゲル中におけるタンパク質の構造の比較.....	12
2.1. 方法	12
2.1.1. 試料	12
2.1.2. ゼル・ゲル法によるシリカゲルへのタンパク質の封入	13
2.1.3. CD スペクトル測定.....	15
2.2. 結果.....	16
2.2.1. ゼル・ゲル法の改良	16
2.2.2. 天然状態の比較	16
2.2.3. 変性剤による変性状態の比較.....	16
2.2.4. 酸変性状態の比較.....	17
2.3. 考察.....	17
2.3.1. シリカゲル中でのタンパク質の構造の特徴付け	17
3 章 シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング反応.....	26
3.1. 方法.....	26
3.1.1. リフォールディング反応の測定.....	26
3.2. 結果	27
3.2.1. CYT のフォールディング反応	27
3.2.2. ELG のフォールディング反応	28
3.2.3. HTL のフォールディング反応	29
3.2.4. BLA のフォールディング反応	30
3.2.5. LYZ のフォールディング反応	30
3.3. 考察	31
3.3.1. シリカゲル中でのフォールディング反応の特性	31
3.3.2. シリカゲル中でのバースト相	33
3.3.3. フォールディング初期段階のキネティクス	34
3.3.4. 初期中間体における二次構造形成	35
4 章 ELG 変異体 A123T のシリカゲル中でのフォールディング反応.....	49
4.1. 方法	49
4.1.1. 変異体 A123T の発現、精製.....	49

4.1.2. A123T の尿素変性転移.....	50
4.1.3. A123T のシリカゲルへの封入およびリフォールディング反応の測定.....	50
4.2. 結果.....	50
4.2.1. A123T の安定性の評価.....	50
4.2.2. シリカゲル中での A123T の構造.....	52
4.2.3. シリカゲル中での A123T のフォールディング反応.....	52
4.3. 考察.....	53
5 章 アレニウス・プロットによるフォールディング初期段階の活性化エネルギーの解析.....	59
5.1. 方法.....	59
5.1.1. 温度別リフォールディング実験.....	59
5.1.2. アレニウス・プロット.....	59
5.2. 結果.....	60
5.2.1. シリカゲル中におけるフォールディング初期段階の活性化エネルギー.....	60
5.3. 考察.....	60
6 章 総論.....	64
6.1. シリカゲル・マトリックスのフォールディング反応への影響.....	64
6.2. フォールディング初期段階におけるポリペプチド鎖の凝縮.....	67
6.3. フォールディング初期段階における活性化エネルギー.....	68
6.4. まとめと展望.....	68
参考文献.....	72
謝辞.....	81

1 章 緒言

1.1. Levinthal パラドックス

タンパク質のフォールディングは、DNA 中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が、その特異的な天然立体構造に折りたたまれる反応である。Anfinsen による実験(1)をはじめとして、多くのタンパク質は変性剤などでいったん変性させても、条件を元に戻すことによって自発的に天然構造に巻き戻ることが証明されている。このことは、天然構造を決めるすべての情報は一次構造であるアミノ酸配列に含まれており、フォールディングはポリペプチド鎖とその周りの水分子を含む系全体の最小自由エネルギー状態に向かって進行する物理化学的な現象であることを示している(熱力学仮説)。天然構造が、水素結合、疎水性相互作用、van der Waals 力、静電相互作用などにより安定化されていることから、フォールディング反応にこれらの相互作用が寄与していることは明らかである。しかし、この熱力学仮説はポリペプチド鎖がとりうる膨大なコンホメーションからいかにして短い時間内に天然構造へと折りたたまれるかの問いには答えていない。たとえば、各アミノ酸残基が 2 つの可能な構造をとるとすると、100 残基からなるタンパク質がとりうる構造の数は、 2^{100} (約 10^{30}) にもなり、これらのコンホメーションをすべてランダムに探索すると、仮に一回のコンホメーション変化にかかる時間を 10^{-11} 秒としても約 10^{12} 年以上かかることになる。それにもかかわらず実際には多くのタンパク質はマイクロ秒から分の時間スケールでフォールディングする。この矛盾は Levinthal パラドックスとして知られている(2, 3)。この問題の解決は、タンパク質が備えた高度なきわめて高度な自己組織能を理解するという点で物理化学的に非常に興味深く、今日までに多くの研究がなされてきている。初期のフォールディング研究においては、フォールディング反応には特定の経路が存在しており、そのためにポリペプチド鎖は広大なコンホメーション空間の探索を回避し効率的にフォールディングしていると考えられた(4)。このようなフォールディングの考え方は「古典的捉え方(classical view)」と呼ばれる。多くの 100 残基以上のタンパク質で、フォールディング中間体が観測されており、フォールディングの経路上に存在する特異的中间体として捉えられてきた。そのため、このようなフォールディング中間体の検出と特徴付けはフォールディング機構の理解につながると考えられ積極的に研究が行われてきた(5)。一方、単純化されたポリ

ペプチド鎖を用いた理論的研究から、フォールディングがエネルギー地形に沿って進行するという新たなモデルが提唱された(6, 7)。このエネルギー地形(energy landscape)は多次元の曲面であり、二次元の構造空間に投影すると、天然構造が基底部に位置するファネル(漏斗)状の形状をしていると考えられている(図 1-1)(8)。このように天然構造に対してバイアスのかかったファネル状のエネルギー地形ではコンホメーションのランダムな探索は必要ないため、Levinthal のパラドックスが容易に解決される。このようなエネルギー地形に基づくフォールディングの概念は、「古典的捉え方(classical view)」に対し、「新しい捉え方(new view)」と呼ばれる(8, 9)。ファネル・モデルでは個々のタンパク質分子がエネルギー曲面上のさまざまな経路を通過してフォールディングすることが可能なため、中間体はフォールディング反応にとって必須な状態ではなく、むしろエネルギー曲面上の局所的なくぼみに速度論的にトラップされた状態であることが提唱されている。この可能性を支持する例として、これまでに、いくつかの 100 残基以下のタンパク質で、中間体を蓄積せずに二状態的にフォールディングすることが報告されている(10, 11)。しかし実際には、多くの 100 残基以上のタンパク質のフォールディング初期段階で中間体が蓄積することが示されている(12-17)。それではなぜ、いくつかの 100 残基以下のタンパク質で二状態的なフォールディング反応が起こるのに対し、多くのタンパク質においてフォールディング初期段階に中間体の形成がみられるのだろうか。このような問題の理解のためには、変性状態から初期中間体にいたるフォールディング過程の詳細な構造情報を得ることが重要である。またそのような研究は、フォールディング反応における重要な相互作用についての理解につながるだろう。しかし、1.3 でも述べるように、フォールディング初期段階の測定はさまざまな実験的な制限によりきわめて困難である。

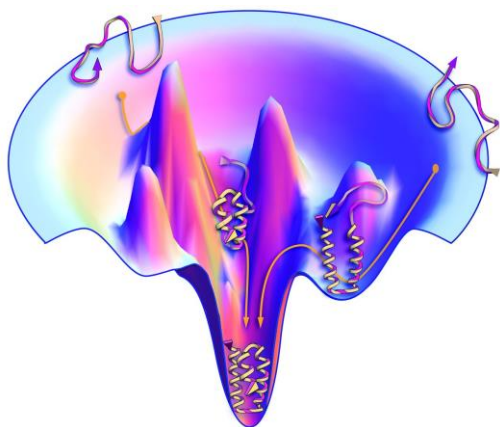


図 1-1. ファネル・モデルの概略図

ファネルの広がりとはコンホメーション空間を、高さは実効エネルギーを表す(8)。

多くのタンパク質で初期中間体が蓄積するという事実は、new view よりもむしろ classical view によるタンパク質フォールディングの捉え方を支持しているように見える。もしかすると、タンパク質フォールディングのファネル状のエネルギー地形の中には主要ないくつかの経路が存在しているのかもしれない。その場合、2 つのフォールディングの捉え方は、このようなフォールディング・ファネルの特性を別々に描写していると考えられることができる。

1.2. モルテングロビュール状態

モルテングロビュール状態は多くの球状タンパク質で穏やかな変性条件下で形成される、天然状態と変性状態の間の中間的な構造である(18, 19)。その共通する特徴として、

- (1) 疎水性コアを形成している
- (2) 多くの二次構造が形成されており、分子半径が天然状態と同様にコンパクトである
- (3) 側鎖の特異的なパッキングが失われており、固定された三次構造を持たない

などの点が挙げられる。また、多くのタンパク質で観測されるフォールディング中間体が平衡論的に観測されるモルテングロビュールと等価な構造であることが知られており、構造の特徴づけが多くの研究で行われてきた(19, 20)。これらの特徴から、フォールディング中間体の形成においては疎水性残基の非特異的な凝縮やポリペプチド鎖に沿って近距離間での相互作用による二次構造の形成が重要であることが考えられる。その後引き続き過程では、分子全体がコンパクト化したことでポリペプチド鎖に沿って遠距離間の相互作用が働けるようになり、三次元の天然立体構造を形成すると考えられる。このような階層的なフォールディングのモデルとして、疎水性凝縮モデル(21-25)や、フレームワークモデル(14, 26)が挙げられる。これらのモデルは天然三次構造の形成に先立って、二次構造の形成が起きるという点では同じであるが、二次構造が形成されるタイミングにおいて違いがある。疎水性凝縮モデルでは二次構造の形成はそれに先行するポリペプチド鎖の疎水的な凝縮によって促されると考えられる。一方、フレームワークモデルではまず二次構造が近距離間の相互作用により形成され、その後ランダムな拡散-衝突によって安定な天然三次元構造を形成すると考えられる。しかし、フォールディング初期段階における二次構造の形成反応は非常に速く、これらのモデルを見分けることは容易ではない。

1.3. フォールディング初期段階の研究

タンパク質のフォールディング反応はマイクロ秒から分にわたる広い時間領域で起きるにもかかわらず、多くのタンパク質でポリペプチド鎖の凝縮や二次構造の形成などの重要なコンホメーション変化はミリ秒以下の時間領域で起こることが多くの速度論的実験によって明らかとなっている(図 1-2)(27-30)。これらの事実から、フォールディング初期段階で形成される構造が、それに続くフォールディング反応を天然構造へと導いている可能性が考えられる。また、図 1-1 のようなファネル・モデルで考えれば、ファネル上部において急激なコンホメーション空間の減少が起こることを明確に示している。したがって、タンパク質のフォールディング反応における重要な相互作用を理解し、フォールディング反応の全容を明らかにするために、フォールディング初期段階の速度論的解析や初期中間体の構造解析が必要不可欠である(31, 32)。

これまでに、フォールディング初期段階の観測のために反応を高速開始する技術の開発が行われてきている。光化学トリガー法はレーザーパルスを用いて配位子を解離させたり、電子移動を誘起してタンパク質の酸化還元状態を素早く変化させ、それに伴うタンパク質の安定性の変化によってフォールディング反応を開始させる(33, 34)。この方法ではナノ秒の時間スケールでフォールディング反応を開始することができるが、適応できるタンパク質は限られている。温度ジャンプ法では低温変性したタンパク質を溶液の温度を瞬間的に上昇させることでリフォールディングさせる。レーザーパルスを用いた温度ジャンプ法では数百ピコ秒程度の非常に短い不感時間を達成することができる(35-39)。しかし、この方法が適応できるのは低温変性するタンパク質に限られている。また、用いる溶液の量も素早い温度上昇の達成のために少量でなければならないため、組み合わせられるプローブは検出感度がよいものに限られる。

これらの方法に対し、迅速混合法は幅広い溶液条件とプローブに適用可能であり、多くのタンパク質のフォールディング研究に用いられている(40-42)。迅速混合法で最も広く用いられてきた手法はストップフロー(stopped-flow)法と連続フロー(continuous-flow)法であり、素早く溶液を混合することでフォールディング反応を開始することができる。しかし、混合には少なくとも数マイクロ秒から数ミリ秒の時間が必要であり、先に述べたレーザーパルスを用いた手法に比べ長い不感時間が生じてしまう。これらの不感時間内に起こる初期反応相はバースト相とよばれており、多くのタ

ンパク質で中間体(バースト相中間体)が蓄積することが確認されている(13, 43, 44)。しかし、この間に起こる変性状態から初期中間体が形成されるまでの反応機構については、時分割測定が困難なため、未だに多くの疑問が残っている(45)。例えば、バースト相内での中間体の形成過程は先に述べた、疎水性凝縮モデル、フレームワークモデルのどちらによって説明できるか、あるいは別のモデルが成り立つのか。また、これまでに観測されているバースト相中間体よりも早い段階の中間体が存在しているのかも明確な実験的証拠は得られていない。また、図 1-1 で示したようなファネル・モデルでいえば、ファネル上部の変性状態と初期中間体の間にエネルギー障壁が存在するかどうかについても議論が続いている(46)。非常に素早く中間体が蓄積するという事実は、フォールディング初期反応には比較的低いエネルギー障壁が存在しているかあるいは、完全にエネルギー障壁のないモデルを支持するのかもしれない。このようなフォールディングのモデルはダウンヒル・フォールディングと呼ばれ理論的研究から提唱されている(6, 47, 48)。フォールディング初期段階の反応を直接追跡する技術の開発は、これらの疑問に新たな知見を与えると期待され、重要な課題の一つである。

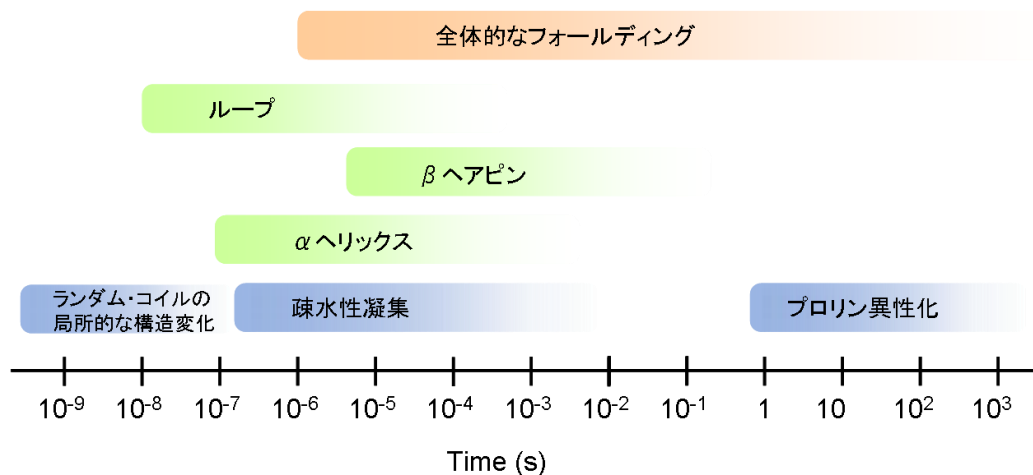


図 1-2. フォールディング反応における、さまざまな過程の典型的な時間領域

1.4. シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング反応

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ゾル・ゲル法によって

作製された湿潤シリカゲル中に封入することができることが報告されている(49-56)。シリカゲルは可視・紫外光に対して透明であり、封入したタンパク質の紫外光吸収、円二色性(CD)などの分光学的測定が可能である。また、多孔性なので、水などの低分子を透過することができる。また、ゾル・ゲル法ではシリカゲルの合成が常温、中性 pH で進行するため、多くのタンパク質の封入に用いることができる。この方法は当初、バイオセンサーなどの機能性ゲルを作製する目的で用いられてきた(49)。その後、シリカゲル中に封入されたタンパク質のグローバルな構造変化の速度が溶液中に比べ大幅に遅くなることが報告された(51, 53, 55, 57-60)。さらに、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することが報告されている(61-64)。柴山による研究では、ウマ心臓シトクロム *c* (CYT)、ウシ β ラクトグロブリン(BLG)、ウシユビキチンのフォールディング速度をシリカゲル中で減速させ、溶液中では時分割測定が難しいミリ秒以下の初期フォールディング反応を数百秒のスケールに拡張することに成功している(61, 62)。CYT では初期中間体の形成過程が引き延ばされた指数関数(stretched exponential function)として観測された(61)。このことは、CYT の初期中間体の形成がエネルギー障壁のないダウンヒル過程であることを示唆している(65)。一方、BLG の場合、初期中間体の形成過程が単一の指数関数として観測され(62)、初期中間体に変性状態と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ている。

シリカゲル中でタンパク質分子のグローバルな構造変化が大幅に減速する原因についてはいまだに解明されていないが、これらの効果が水を介した非特異的な作用によってもたらされていることが示唆されている(55, 63, 66, 67)。また、多くの研究で、シリカゲル中など狭い空間内での水分子のダイナミクスが溶液中と異なることが報告されている(68-72)。

1.5. 本研究の目的

本研究は、1.3.でも述べたように、これまでに開発されている手法では時分割測定が困難であったフォールディング初期段階について焦点をあてている。具体的には、従来の溶液における実験でバースト相として観測される反応が単一の反応なのか、あるいは多段階の反応から成るのかについてや、変性状態と初期中間体の間にはエネルギー障壁があるのか、それとも初期中間体の形成はダウンヒル過程であるのかについて明らかにすることを目的としている。これらの情報を得る

ために、フォールディング反応開始数ミリ秒以内にバースト相中間体を形成することが知られているウマ β ラクトグロブリン(ELG)、ヒト涙リポカリン(HTL)、ウシ α ラクトアルブミン(BLA)、ニワトリ卵白リゾチーム(LYZ)をシリカゲル中に封入し、それらの中間体の形成過程を大幅に減速させることで時分割測定した。反応の検出には CD を用いた。また、フォールディング初期段階についてのエネルギー論的な知見を得るためにフォールディング初期段階の反応速度を温度を変えて測定し、それらの温度依存性をアレニウス・プロットを用いて解析した。

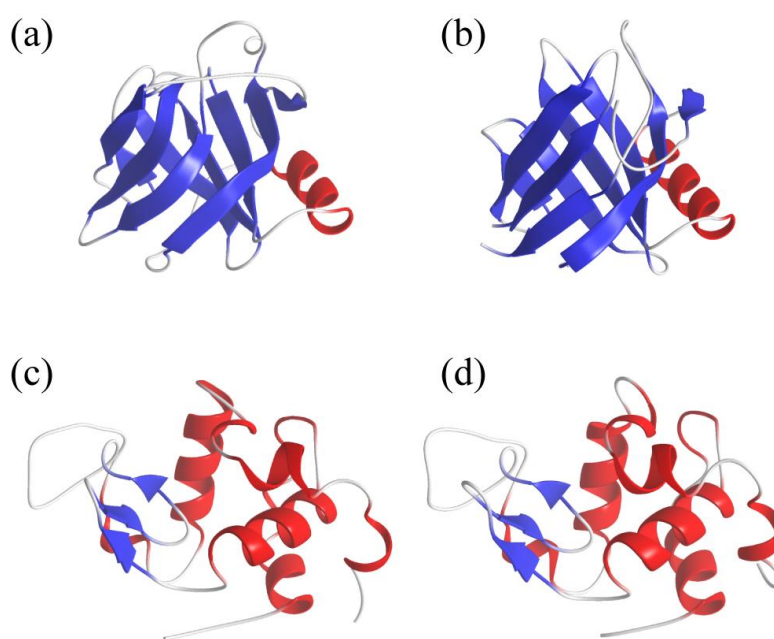


図 1-3. 本研究で用いたタンパク質の天然構造

(a) ELG (73)、(b) HTL (74)、(c) BLA (75)、(d) LYZ (76)。

α ヘリックスは赤で、 β ストランドは青のリボンで示した。

ELG と HTL はそれぞれ 162 残基と 158 残基のアミノ酸からなり、リポカリンファミリーに属している。アミノ酸配列の相同性は 20% 程度と低いが、互いによく似た天然構造をもつ(図 1-3 (a),(b))。それらの立体構造は、A から I の 9 本の β ストランドと一本の α ヘリックスをもち、A から H の 8 本のストランドが逆平行の β バレル構造を形成していることが明らかになっている。CD ストップフロー

法による ELG のフォールディング反応の研究から、初期段階に非天然の α ヘリックスをもつ中間体が過渡的に蓄積することが明らかとなっている(77)。一方、HTL はフォールディング初期段階に分子半径がコンパクトになることが X 線小角散乱の実験から明らかとなっているが、二次構造については変化量が小さく、初期段階における反応が、変性剤濃度の減少によるポリペプチド鎖の非特異的な凝縮なのか、あるいは二次構造形成を伴う中間体の形成なのかははっきりしていない(78)。

BLA と LYZ はそれぞれ 123 残基と 129 残基からなるタンパク質で C 型リゾチームファミリーに属する。互いによく似た立体構造をもち、4 本の α ヘリックスと1本の 3_{10} ヘリックスをもつ α ドメインと、3 本の β ストランドと1本の 3_{10} ヘリックスをもつ β ドメインからなる(図 1-3 (c),(d))。これらのタンパク質のフォールディング反応は広く研究されており、初期中間体の構造について詳細な特徴付けがなされている(19, 79-87)。

2章 溶液中とシリカゲル中におけるタンパク質の構造の比較

シリカゲルのマトリックス表面には負電荷をもったシラノール基(Si-OH)が豊富に存在していることからタンパク質と静電的な相互作用をする可能性がある。また、シリカゲルに封入されたタンパク質はゲルのマトリックス構造によって空間的に制限されているため混み合い効果(crowding effect)や排除体積効果(excluded volume effect)などの影響を受けている可能性がある。したがって、従来用いられてきた希薄溶液とは異なるシリカゲル中でのタンパク質フォールディングを測定するにあたり、ゲル中におけるタンパク質の性質を調べておくことが必要である。

ゾル・ゲル法ではシリカゲルは溶液のアルコキシドを前駆体として、加水分解、縮合反応を通して合成される。本研究では標準的なゾル・ゲル法(49)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。シリカゲルのマトリックスは個々のタンパク質分子を取り囲むように形成されると考えられるので、変性状態で封入するとフォールディング反応がマトリックスによって妨げられ天然構造へ到達できないことが考えられる。したがって、本研究ではタンパク質の天然構造を保ったままシリカゲルへ封入することにした。また、天然状態で封入することで、シリカゲル中でも溶液中と同様に立体構造を保持できることが証明できる。今回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。この改良によって、本研究でもちいた全てのタンパク質で溶液中と同様の天然構造を保ったまま封入することに成功した(以下参照)。

本実験では封入したタンパク質の構造をいくつかの条件のもとで遠紫外CDスペクトルを用いて測定し、対応する溶液中のスペクトルと比較することでゲル中の環境がタンパク質の構造に与える影響について調べた。

2.1. 方法

2.1.1. 試料

ELG と BLA はそれぞれウマとウシのミルクから精製、凍結乾燥されたものを使用した(88)。それぞれの純度は SDS-PAGE と Native-PAGE で確認を行った。HTL は、以前に塚本らが作製、精製

した、変異体 C101A を使用した。この C101A の天然構造は野生型と同じであることが確認されている(78)。また、LYZ、CYTはそれぞれ生化学工業株式会社とSigmaから市販されているものを使用した。

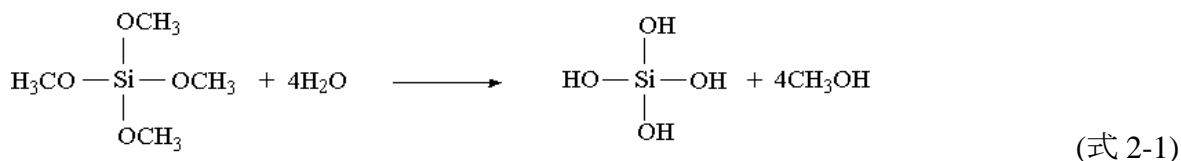
2.1.2. ゼル・ゲル法によるシリカゲルへのタンパク質の封入

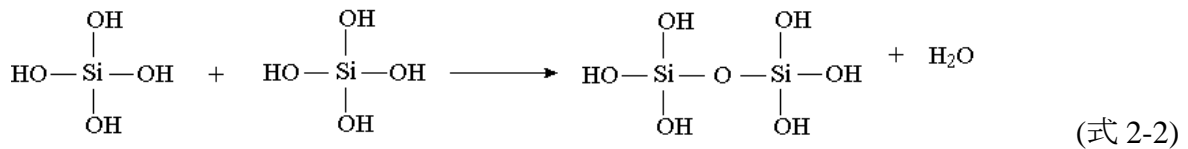
メタノールによるタンパク質の変性を回避するため、以下に示す 2 通りの方法でシリカゲルへのタンパク質の封入を行った。

<方法 1>

この方法ではメタノール濃度を下げするために、標準的なゼル・ゲル法に比べてゼル中の水の相対量を増加させた。具体的な手順を以下に示す。

- 1) オルトケイ酸テトラメチル (略称 TMOS: Tetramethyl orthosilicate) (東京化成)1ml に等量の水を加え、酸触媒として 0.1M HCl を 0.02 ml 加えた。
- 2) 4°C で 40 分間超音波洗浄機にかけ、二相に分離していた混合液を均一にした。まず、TMOS のメチル基が加水分解され、 $\text{Si}(\text{OH})_4$ が生成する(式 2-1)。次にシラノール基間での脱水縮合反応が起こり、シロキサン基(Si-O-Si)が生成する(式 2-2)。この縮合反応は連鎖的に進行し、隣り合ったシラノール基同士で脱水の過程を繰り返す、いわゆる重縮合の反応が進行する。HCl は縮合反応の触媒としてはたらく。しかし、pH が低い状態では完全には縮合反応は進まず、この段階では流動性のあるゼルである。また、4°C にしておくことで、1 週間程度は保存することが可能である。





3) 10mg/ml のタンパク質ストック溶液(0.2Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.1))と2)で作製したゾルを 4°C において、体積比 3:2 で混合し、0.1mm 石英セル(東ソークォーツ)の上にテフロンシートをかぶせて均一に薄くのばした(図 2-1(a))。pH の上昇に伴い、ゾルはさらに縮合し室温で 1 分以内にゲルに転移する。シリカゲルのマトリックスは個々のタンパク質分子を囲むように形成されると考えられる。

4) 縮合反応は 25°C でさらに ELG、HTL、BLA で 2 時間、LYZ、CYT で 6 時間行った。これらの時間はリフォールディング反応を観測するのに適した速度まで遅くするために選んだ。縮合反応は蒸留水に浸し HCl をゲルから除くことで停止させた。その後、ゲルの乾燥を防ぐために、石英プレートでカバーした(図 2-1(b))。

このようにしてタンパク質をシリカゲル中に封入した。ゲルの厚さを 0.1mm にする理由は、ゲル内の緩衝液置換を短い時間で起こすため、このように薄いゲルを用いることでリフォールディング実験の際に短い時間領域内に起こる反応を追跡することが可能となる。方法 1 で作製されたゲルの密度は標準的な方法によって得られるゲルよりも低いため、より短い時間でゲル内部の低分子の拡散が起こる(3.1 参照)。

<方法 2>

方法 1 によって得られるゾルでは、メタノールの濃度は下がるものの、同時にゾルの濃度も低くなってしまったため、密度の高いゲルを用いるような実験には向かない。そこで、方法 2 では、TMOS の加水分解によって発生するメタノールを気化させるために、乾燥窒素ガスによるゾルのバブリング操作を行った。具体的な手順を以下に示す。

1) 方法 1 の 1)、2)と同じ手順でゾルを作製した。

2) ゼルの入った試験管を 45°C の恒温槽に設置し、乾燥窒素ガスの細かい気泡をゼルの下部から送り込んだ。この時、メタノールが気化していくに伴いゼルの粘度が高くなるので、泡が試験管からあふれないように送り込むガスの量に注意する。

3) ゼルの温度を 4°C にし、その後、方法 1 の 3)、4)と同じ手順で試料を作製した。

2.1.3. CD スペクトル測定

CD 測定は Chirascan (Applied photophysics) と J-720 spectropolarimeter (日本分光) を用いて測定した。溶液サンプルとゲルサンプルの CD スペクトル(200-250nm) の測定には 1mm 石英セル、0.1mm 石英セルをそれぞれ用いた。測定は 25°C で行った。タンパク質濃度は、溶液サンプルの場合、吸光係数 ϵ_{280} (ELG : 12,000 M⁻¹ cm⁻¹、HTL : 13,000 M⁻¹ cm⁻¹、BLA : 28,500 M⁻¹ cm⁻¹、LYZ : 37,600 M⁻¹ cm⁻¹、CYT : 23,000 M⁻¹ cm⁻¹)として UV 吸収スペクトルから算出した。ゲルサンプルの場合は、濃度既知の溶液サンプルとの 215-225nm の UV 吸収度の積分値の比を用いてタンパク質濃度を求めた。UV 吸収スペクトルは UV-2450 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)を用いて測定した。

ゲル内の緩衝液置換は作製したゲルサンプルを溶液に浸すことで行った。緩衝液置換の速度は、ゲルからのグアニジンの拡散からもとめた。まず、タンパク質を含まないゲルを 6M グアニジン塩酸塩 (GdnHCl) 溶液に 3 分間浸した。その後 300ml の DW に移し、5 秒ごとにゲル中の GdnHCl 濃度を 207.5nm の UV 吸収で観測した(図 2-1(c))。

封入されたタンパク質が溶液中と同様の天然構造を保てることを確認するために、ゲル封入後の試料を以降のフォールディング実験で用いたリフォールディング用の緩衝液(ELG は 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2)を、HTL、BLA は 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) を、LYZ は 0.2M リン酸 (pH1.8)、CYT は 0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.5))に 25°C で 3 分間浸し CD スペクトルを測定した。pH4.5 以下の場合、高濃度のリン酸緩衝液を用いて緩衝能を保った。続いて、封入されたタンパク質が、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 6M グアニジン塩酸塩 (GdnHCl)を含む変性溶液(6M GdnHCl + リフォールディング緩衝液)に 25°C で 3 分間浸し、CD

スペクトルを測定した。また、酸性条件下で中間体を形成することが知られている、ELG、HTL、BLA、CYTについてはゲル封入後、0.2Mリン酸(pH1.8)に25°Cで3分間浸し、酸変性状態のCDスペクトルを測定した。

2.2. 結果

2.2.1. ゼル・ゲル法の改良

方法1および2で得られた厚さ0.1mmのシリカゲルはともに透明で、構造的に安定であり分光学的測定が可能であった。しかし、方法2で合成した場合、窒素ガスによるバブリング中にメタノールとともに水も気化してしまい、さらに送り込むガスの量や位置のわずかな違いでそれらの気化のしかたに差が出たため、再現性の高いゲルを得ることが困難であった。したがって、本研究ではこれ以降、方法1で得られたシリカゲルを用いて実験を行うことにした。しかし、方法2ではゾル中のメタノール濃度が十分に低くなっているため、高密度のシリカゲルを合成することに成功した。今後、タンパク質よりも低分子のペプチドなどを封入する際、ゲルからの漏出を防ぐためにこのような高密度のゲルが有用になることが期待される。

2.2.2. 天然状態の比較

本研究で用いたシリカゲルが、タンパク質の天然構造に変化をもたらさないかを確認するために、天然条件下における封入後のタンパク質の構造をCDスペクトルにより測定し、溶液中でのスペクトルと比較した(図2-2~2-6)。その結果、すべてのタンパク質において、ゲル中で観測された天然条件下のCDスペクトルが溶液中での天然構造のスペクトルと非常によく一致した。これらの結果から、方法1で合成されたシリカ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ていることが確認された。

2.2.3. 変性剤による変性状態の比較

変性剤による変性についてもCDスペクトルより、シリカゲル中ですべてのタンパク質が溶液中と同様に変性することが示された(図2-2~2-6)。一般的に変性剤存在下ではポリペプチド鎖は広がったほどけた状態になることが知られており、本実験の結果は、ゲルマトリックスによる立体障害が

タンパク質のコンホメーション変化を束縛していないことを示している。天然構造の結果と合わせると、本実験で用いたシリカゲル中でもフォールディング反応が起こるために必要な空間が十分に存在していることが示唆された。

2.2.4. 酸変性状態の比較

ELG、HTL、BLA のシリカゲル中と溶液中での酸変性状態の CD スペクトルを図 2-2~2-4 に示す。これら3種類のタンパク質で、ゲル中の酸変性状態の CD スペクトルが溶液中のものに比べて変化がみられた。共通する変化として 210nm 付近から 220nm 付近の強度が溶液中に比べ減少し、一方 200nm 付近の強度が増加していた。一般的に α ヘリックスの CD スペクトルは 222nm と 208nm 付近に負の大きな強度を、 β シートの CD スペクトルは 215nm 付近に負の大きな強度を示す(図 2-7)。一方、無秩序な構造のポリペプチド鎖は 200nm 付近に負の大きな強度を示す(図 2-7)。これらのスペクトルの特徴から、シリカゲル中では、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造の量が減少し無秩序な構造が増加していることが示された。

CYT のシリカゲル中と溶液中での酸変性状態の CD スペクトルを図 2-6 に示す。ELG、HTL、BLA の場合と異なり、ゲル中の酸変性状態の CD スペクトルが溶液中のものと同様一致した。

2.3. 考察

2.3.1. シリカゲル中でのタンパク質の構造の特徴付け

上記の結果から、本実験で用いたタンパク質が溶液中と同様の天然構造を保持できることが明らかとなった。溶液中と同様の天然構造が保たれていることは、タンパク質分子がシリカゲル内の水分子によって十分に水和していることを示している。タンパク質の天然構造はある定められた物理的条件下における最小エネルギー構造に対応しており、タンパク質のフォールディング反応は、アンフォールディング状態のポリペプチド鎖がいくつかの中間体を経てこの最小エネルギー構造に到達する一連の反応だと考えられる。したがって、シリカゲル中においても、ポリペプチド鎖がもつ最小エネルギー構造は溶液中で観測される天然構造と同様であり、シリカゲル中でもフォールディング反応によって溶液中と同様の天然構造を獲得できることが示唆された。

一方、シリカゲル中では ELG、HTL、BLA の酸変性状態の二次構造含有量が減少していることが CD スペクトルの変化から示された(図 2-2~2-4)。しかし、それぞれのスペクトルの形状は溶液中のものによく似ており、ゲル中でも二次構造上の特性は保持していると考えられる。特に、酸変性状態で非天然の α ヘリックスを形成することが知られている ELG では、ゲル中でも酸性条件下で非天然の α ヘリックスを形成していることが CD スペクトルの形状と強度から確認できた。以上の結果から、シリカゲルが与える影響は中間体の構造を変化させるが、中間体よりも安定な天然状態の構造を変化させる程の大きい影響ではないと推測できる。CYT の酸変性状態はゲル中と溶液中でよく一致したスペクトルを示したが、これは CYT の大部分の二次構造が酸性条件下で失われているためだと考えられる。変性剤による変性状態もすべてのタンパク質でゲル中と溶液中でよく一致したスペクトルが観測されたが、これらも同様に二次構造が失われているためだと考えられる。

シリカゲルがもたらすこれらのタンパク質の構造安定性の低下については、過去の研究において、シリカゲル中における水の構造化が原因であることが示唆されている(66, 67)。すなわち、ゲルマトリックスの表面に対して配向した水分子によってゲル孔内の系全体のエントロピーが減少し、タンパク質の構造形成に対する自由エネルギー変化の相対量が小さくなることで結果的にタンパク質の構造安定性の低下が引き起されていると推測されている。また、シリカゲルを浸す溶液にアルコールやホフマイスター系列のイオン、オスモライト、界面活性剤、ポリエチレングリコールを加えることで、タンパク質中の二次構造が安定化することが明らかになっている(66, 67)。これらの現象は、加えられた溶質によって構造化した水が摂動を受けることで無秩序化し、系全体のエントロピーが増加したことで結果的にタンパク質の構造安定性が増加したためであると推測されている。今後の実験でこれらの溶質を加えることで、ゲル中でも溶液中と同様の CD スペクトルをもつ酸変性状態をつくることができるかもしれない。

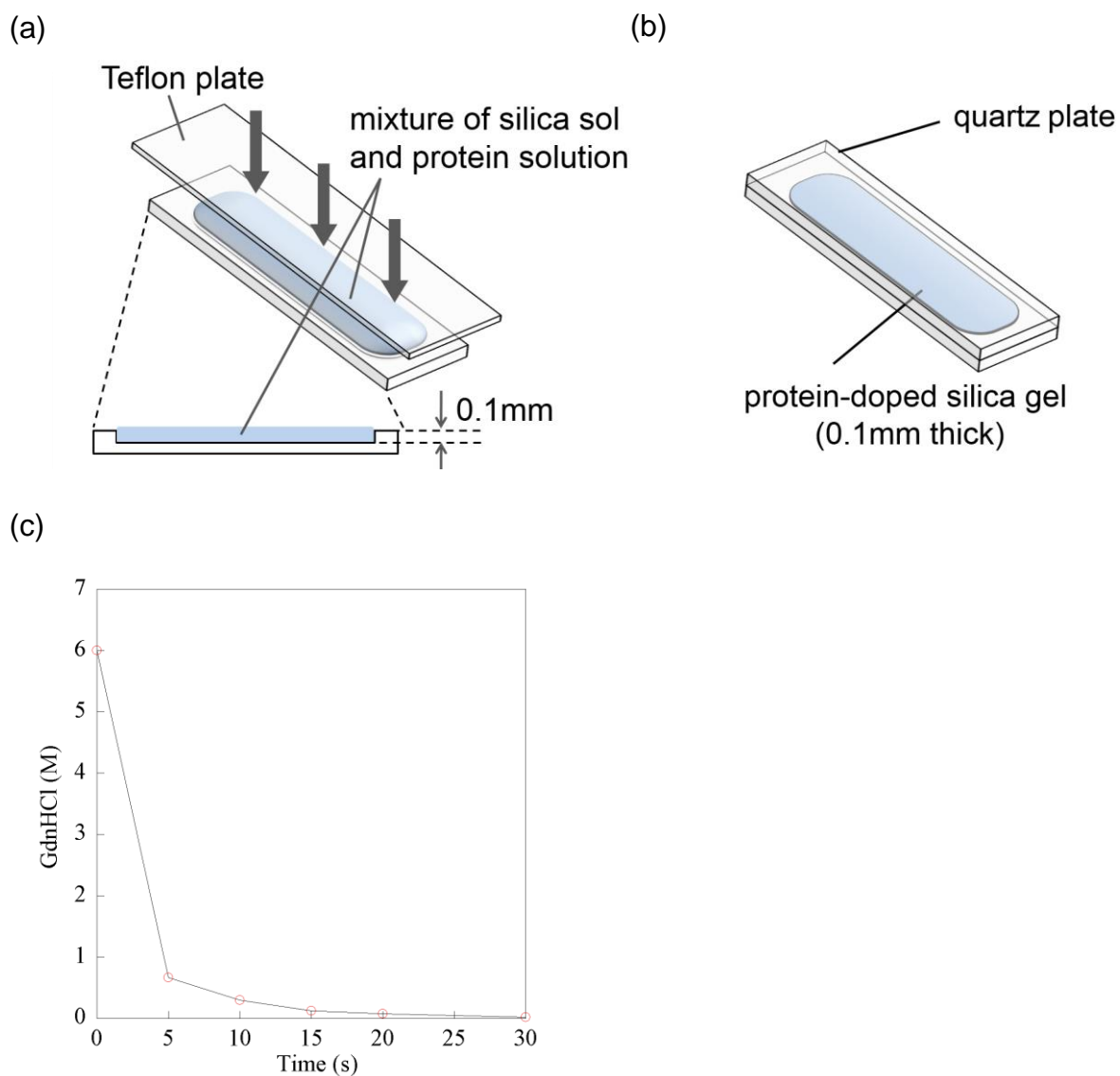


図 2-1. (a) 厚さ 0.1mm のシリカゲルの作製。(b) CD スペクトル測定時は石英プレートでカバーした。(c) シリカゲルからの GdnHCl の拡散測定。GdnHCl の拡散は 25°C で行い、各時間での GdnHCl 濃度は 207.5nm での UV 吸収から求めた。最初の 5 秒間はピペッティングを行い、UV 吸収の測定時は図 2-1(b)のように石英プレートでカバーした。

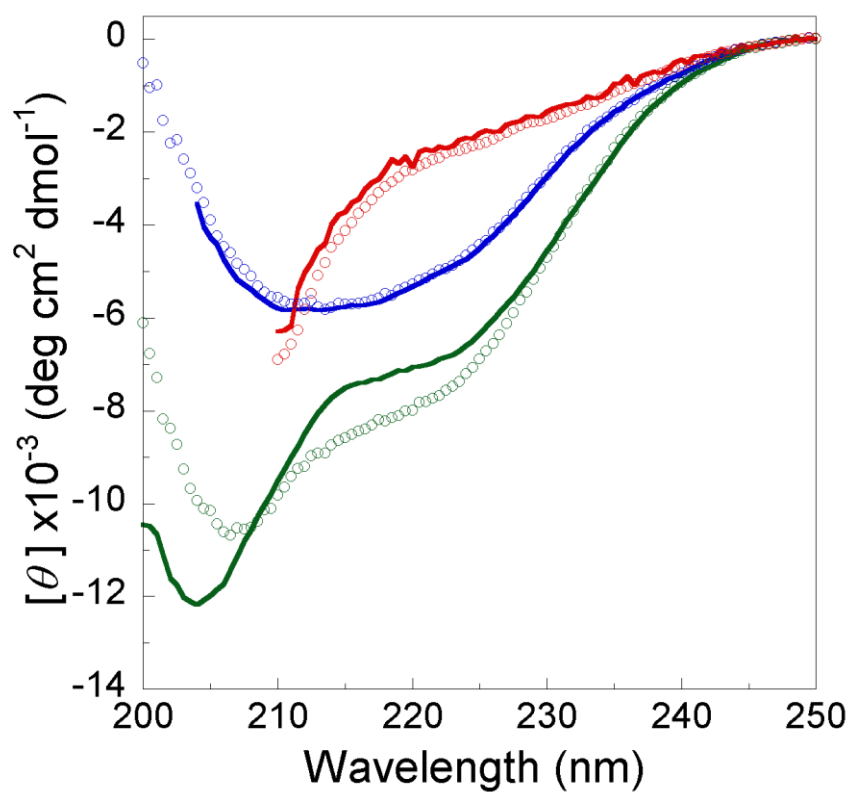


図 2-2. ELG の遠紫外 CD スペクトル

シリカゲル中でのスペクトルは実線、溶液中でのスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 1M リン酸カリウム緩衝液(pH 4.2)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、1M リン酸カリウム緩衝液(pH 4.2)、酸変性状態(緑色)は 0.2M リン酸(pH 1.8)で測定した。

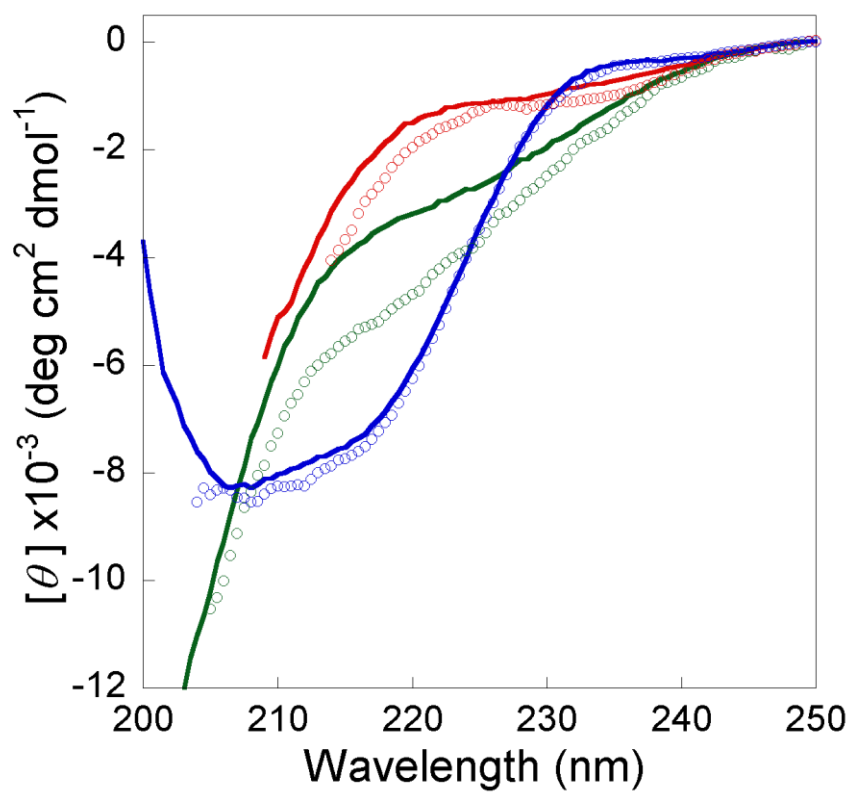


図 2-3. HTL の遠紫外 CD スペクトル

シリカゲル中でのスペクトルは実線、溶液中でのスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、酸変性状態(緑色)は 0.2M リン酸 (pH 1.8)で測定した。

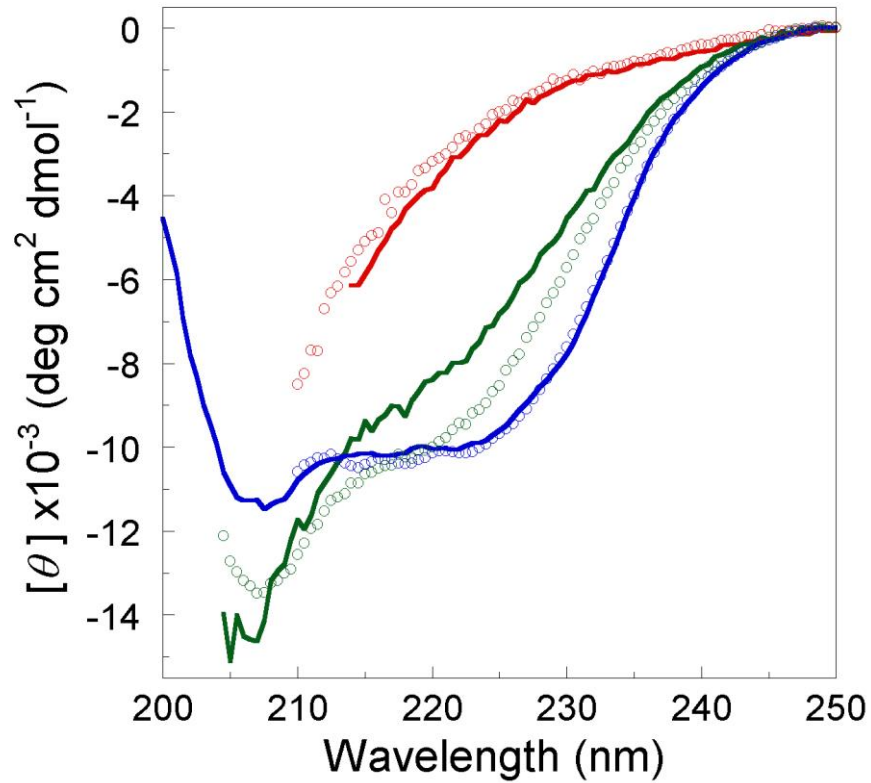


図 2-4. BLA の遠紫外 CD スペクトル

シリカゲル中でのスペクトルは実線、溶液中でのスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0)、酸変性状態(緑色)は 0.2M リン酸 (pH 1.8)で測定した。

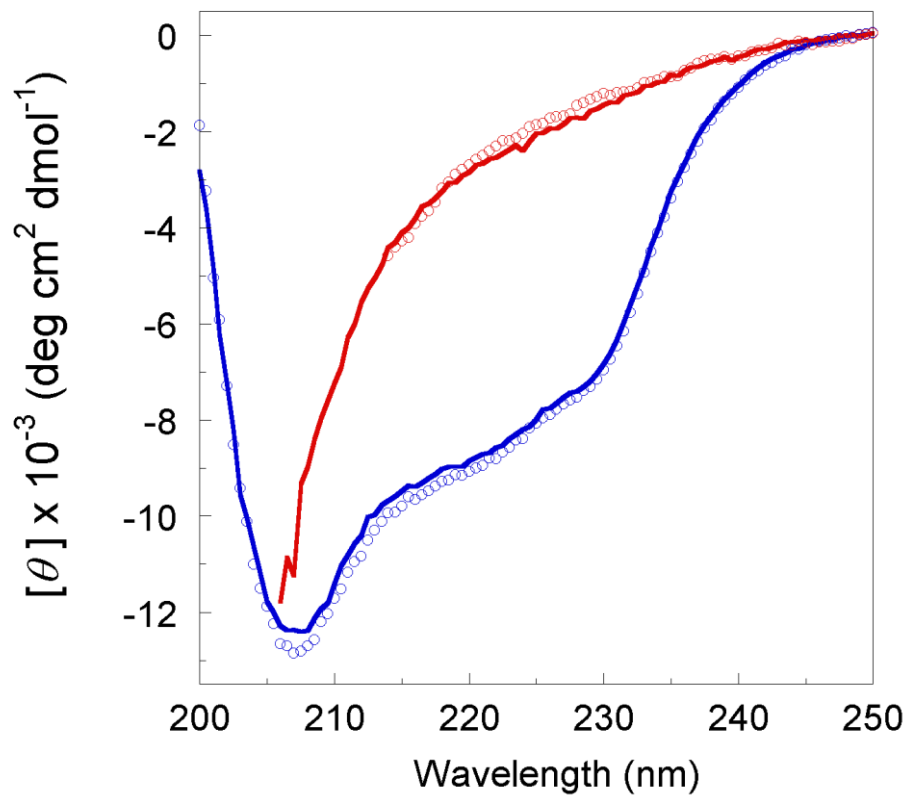


図 2-5. LYZ の遠紫外 CD スペクトル

シリカゲル中でのスペクトルは実線、溶液中でのスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 0.2M リン酸 (pH1.8)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、0.2M リン酸 (pH1.8)で測定した。

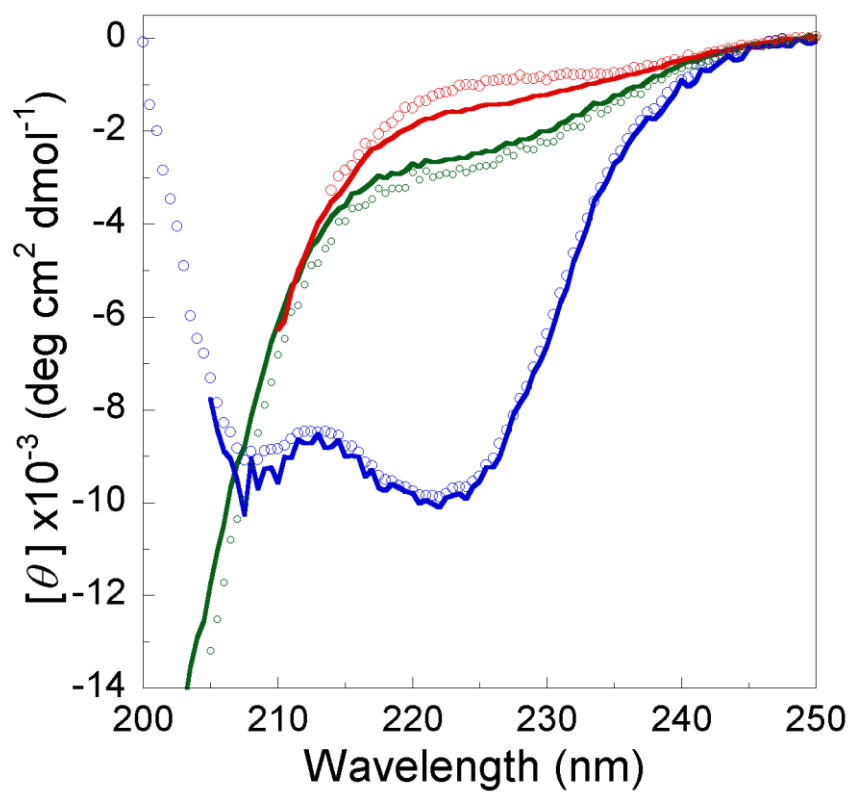


図 2-6. CYT の遠紫外 CD スペクトル

シリカゲル中でのスペクトルは実線、溶液中でのスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.5)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.5)、酸変性状態(緑色)は 0.2M リン酸 (pH 1.8)で測定した。

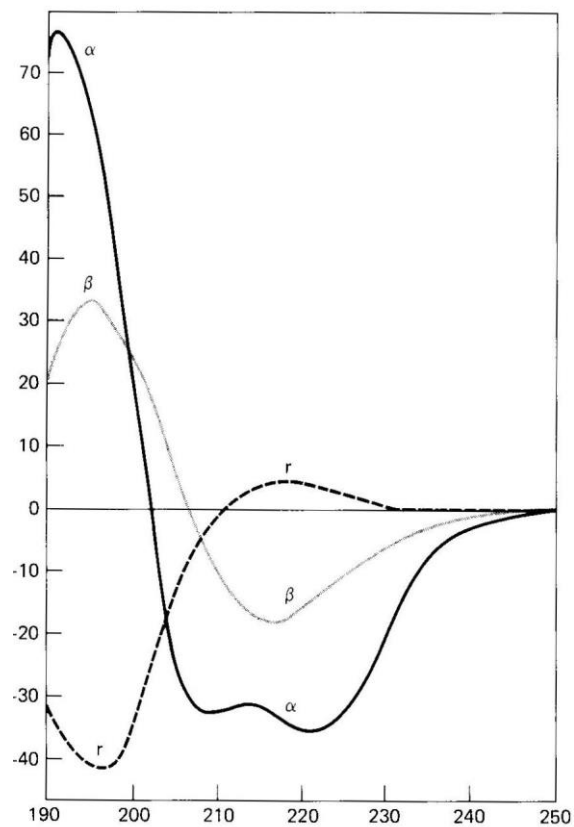


図 2-7. 二次構造の遠紫外 CD スペクトル(89)

poly-L-lysine の α ヘリックス(α)、 β ストランド(β)、ランダムコイル(r)における CD スペクトル。

3 章 シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング反応

2 章で示したように、シリカゲルに封入されたタンパク質は構造変化を起こすことができ、フォールディング反応が行える可能性が示された。また、ゲル内の環境がタンパク質の安定性に影響をあたえることもわかった。したがって、ゲル内ではフォールディング反応自体が変化する可能性も十分に考えられる。まず、本実験で用いたゲルが、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(61)。つづいて、ELG、HTL、BLA、LYZ のシリカゲル中でのフォールディング反応を CD を用いて観測し、それらの特徴付けを行った。

3.1. 方法

3.1.1. リフォールディング反応の測定

ゲル試料の作製および、変性反応、CD スペクトルの測定は 2 章と同様に行った。リフォールディング反応は、変性反応後にゲルをリフォールディング緩衝液(ELG は 1M リン酸カリウム緩衝液(pH4.2)を、HTL、BLA は 0.2M リン酸カリウム緩衝液(pH7.0) を、LYZ は 0.2M リン酸(pH1.8)、CYT は 0.5M リン酸カリウム緩衝液(pH4.5))に浸し、ゲル内の緩衝液を置換することで誘起した。それらにかかる時間は、ゲルからの GdnHCl の拡散時間から推測した。まず、6M GdnHCl 溶液にタンパク質を含まないシリカゲルを 3 分間浸し、その後、特注の 3 面の石英セルにゲル試料を図 3-2 のようにセットした。セル内に 3.6 ml の DW を注ぎ最初の 5 秒間はピペッティングで攪拌した。測定は 25 °C と 4 °C で行い、ゲル中の GdnHCl 濃度の変化は 207.5nm の UV 吸収で観測した。どちらの温度でも拡散開始 5 秒以内にはゲル内の GdnHCl 濃度は 6M から 1M 付近に低下することがわかった(図 3-1)。そこで、300 秒までのリフォールディング反応の測定には、同様に組み立てたセルに 3.6 ml のリフォールディング緩衝液を注入し 5 秒間ピペッティングした後の反応を 214~234nm の各波長の CD 強度変化で追跡した。長期間のリフォールディング反応は CD スペクトルの変化で追跡した。また、シリカゲルのサンプルは乾燥を防ぐために石英プレートでカバーし、内側に 1ml の同じ組成のシリカゲル(タンパク質は含まない)を塗り広げた、口径 1.5

cm、高さ 12.5 cm のガラス製の試験管内に入れてゴム栓をして保存した。リフォールディング反応の測定は最低 3 回行い、再現性を確認した。リフォールディング中にゲルからのタンパク質の漏れが起きないことはタンパク質の UV 吸収で確認した。

3.2. 結果

3.2.1. CYT のフォールディング反応

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 3-3 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。

次に、フォールディング反応開始後 10 秒から 5 分までの CD 強度の変化を追跡した(図 3-4(a))。観測されたリフォールディング反応曲線を、以前の柴山による研究と同様に以下の式 3-1 を用いて解析を行った。

$$\theta(t) = \theta_{\infty} - \theta_f \exp\left\{-\left(k_f t\right)^{\beta}\right\} - \theta_s \exp\left\{-\left(k_s t\right)\right\} \quad (\text{式 3-1})$$

ここで、 $\theta(t)$ は反応時間 t における CD 値、 θ_{∞} は反応が平衡に達した時点での CD 値で、 θ_f 、 θ_s はそれぞれ速い反応相と遅い反応相での振幅である。 k_f 、 k_s はそれぞれ速い反応相と遅い反応相の速度定数である。また、 β は引き伸ばし因子とよばれ速度定数が時間に依存して変化することを表す($\beta=1$ の場合は単一の指数関数的速度過程になる)。解析の結果、 β は 1 に近い値を示した。以前の柴山による研究でも CD によって観測した場合、速い速度相の β は 1 に近い値を示していた。したがって、これ以降は β を 1 に固定して解析を行った。測定を行ったすべての波長でこの理論曲線は実験データとよく一致し、3 分後のスペクトルで表される中間体が速い速度相によって形成されることがわかった。さらに、このスペクトルは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(6I)。これらスペクトルは溶液中ではサブミリ秒の時間領域で蓄積するバースト相中間体のものとよく似ている(90, 9I)。CYT の初期中間体では主要な 3 本の α ヘリックス

が部分的に形成されていることがパルスの水素交換実験からわかっている(15)。

次に得られた理論曲線を $t = 0$ に外挿した結果、CD 値は 酸変性状態の値を下回っていた(図 3-3 の丸、図 3-4(a))。これは、測定の不感時間内にさらに別の反応相が存在していることを示している。柴山による以前の研究でも同様の CD 値の変化が測定の不感時間内に観測されており、蛍光と紫外光吸収による測定の結果から変性状態における His18 のヘムへの配位によるものであることがわかっている(61)。

以上の結果から、本実験で用いたゲル中でのリフォールディング実験が、標準的な方法で得られたゲル中でのリフォールディング実験と同様の結果をもたらすことが確認できた。

3.2.2. ELG のフォールディング反応

ELG のフォールディング反応は GdnHCl 濃度を 6M から 0M へジャンプさせることで誘起した。図 3-5 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。リフォールディング反応開始 3 分後の CD スペクトルは天然状態に比べて大きい強度を示し、その後、時間経過とともにゆっくりと天然状態に近づいていった。図 3-6(a) にフォールディング反応開始後 5 秒から 3 分までの CD 強度の変化を示す。観測されたリフォールディング反応曲線は一つの反応相をもつと仮定し、以下の式 3-2 を用いて解析を行った。

$$\theta(t) = \theta_{\infty} - \theta_f \exp(-k_f t) \quad (\text{式 3-2})$$

ここで、 $\theta(t)$ は反応時間 t における CD 値、 θ_{∞} は反応が平衡に達した時点での CD 値で、 θ_f 、 k_f はそれぞれ初期反応における振幅と速度定数である。測定を行ったすべての波長でこの理論曲線は実験データとよく一致し、3 分後のスペクトルで表される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることがわかった。次に得られた理論曲線を $t = 0$ に外挿した結果、CD 値は変性状態の値を下回っていた(図 3-5 の丸、図 3-6(a))。これは、測定の不感時間内にさらに別の反応相が存在していることを示している(3.3.2.参照)。

CD ストップフロー法を用いたリフォールディング実験からは、ELG は不感時間内(< 25ms)に非天然の α ヘリックスをもつ中間体が蓄積すること、また、そのバースト相中間体は酸変性によつ

て生じるモルテングロビュール状態と等価な構造であることが明らかになっている(77, 92)。プロリン置換変異体を用いた酸変性状態の構造の研究からは、これらの非天然の α ヘリックスは、天然構造における H スtrandから α ヘリックスの N 末端をつなぐ領域に形成することがわかっている(92, 93)。本実験の結果、リフォールディング開始 3 分以内に蓄積する初期中間体の CD スペクトルはゲル中の酸変性状態と一致しており、その形状から非天然の α ヘリックスを形成していることが示された(図 3-5)。したがって、これらの結果から、ゲル中で観測されたこの初期中間体は溶液中でのバースト相中間体に対応すると考えられる。

3.2.3. HTL のフォールディング反応

HTL のフォールディング反応は GdnHCl 濃度を 6M から 0M へジャンプさせることで誘起した。図 3-7 にゲル中での HTL のフォールディング反応における CD スペクトルの変化を示した。また、図 3-8(a)にフォールディング反応開始後 5 秒から 3 分までの CD 強度の変化を示す。観測されたリフォールディング反応曲線は一つの反応相をもつと仮定し、ELG と同様に式 3-2 を用いて解析を行った。測定を行ったすべての波長で式 3-2 で表されるこの理論曲線は実験データとよく一致し、3 分後のスペクトルで表される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることがわかった。次に得られた理論曲線を $t = 0$ に外挿した結果、CD 値は変性状態の値を下回っていた(図 3-7 の丸)。これは、測定の不感時間内にさらに別の反応相が存在していることを示している(3.3.2.参照)。

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かかわらず、溶液中のフォールディング実験で観測されるバースト相中間体は非天然の α ヘリックスを形成しないことがわかっている。これらの中間体の二次構造の違いはアミノ酸配列の α ヘリックス形成傾向に原因があると考えられている。また、HTL のバースト相中間体の CD スペクトルは 215nm 付近と 230nm 付近にそれぞれ特徴的な極小と極大を示し、部分的に天然様の β シート構造を持っていることが示唆されている。

興味深いことに、溶液中では酸変性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にもかかわらず(78)、本実験で観測されたフォールディング開始 3 分後の CD スペクトルはゲル中

での酸変性状態のものとよく一致した(図 3-7)。また、その形状は溶液中で観測されているバースト相中間体のものとは異なり、215nm 付近の極小と 230nm 付近の極大はみられなかった。その後、CD スペクトルは時間経過とともにゆっくりと天然状態に近づいていった。

3.2.4. BLA のフォールディング反応

BLA のフォールディング反応は GdnHCl 濃度を 6M から 0M へジャンプさせることで誘起した。図 3-9 にゲル中での BLA のフォールディング反応における CD スペクトルの変化を示した。また、図 3-10(a)にフォールディング反応開始後 5 秒から 3 分までの CD 強度の変化を示す。観測されたリフォールディング反応曲線は一つの反応相をもつと仮定し、式 3-2 を用いて解析を行った。測定を行ったすべての波長で式 3-2 で表される理論曲線は実験データとよく一致し、3 分後のスペクトルで表される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることがわかった。次に得られた理論曲線を $t = 0$ に外挿した結果、CD 値は変性状態の値を下回っていた(図 3-9 の丸)。これは、測定の不感時間内にさらに別の反応相が存在していることを示している(3.3.2. 参照)。

溶液中のフォールディング実験で観測される BLA のバースト相中間体は酸変性状態と等価な中間体であることが知られている(79, 80)。酸変性状態は、 α ドメインのみが形成されたモルテングロビュール状態であることが知られている(94)。また、パルス的水素交換実験から、バースト相中間体では α ドメイン中の α ヘリックスが形成していることがわかっている(94)。

ゲル中で観測された BLA の初期中間体のスペクトルはゲル中での酸変性状態のものと一致した(図 3-9)。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バースト相中間体および酸変性状態とよく似た特徴を示した(80)。これらのことから、ゲル中で観測された BLA の初期中間体は溶液中のバースト相中間体に対応する中間体であると考えられる。その後、CD スペクトルは時間経過とともにゆっくりと天然状態に近づいていった。

3.2.5. LYZ のフォールディング反応

LYZ のフォールディング反応は GdnHCl 濃度を 6M から 0M へジャンプさせることで誘起した。

図 3-11 にゲル中での LYZ のフォールディング反応における CD スペクトルの変化を示した。また、図 3-12(a) にフォールディング反応開始後 5 秒から 3 分までの CD 強度の変化を示す。観測されたリフォールディング反応曲線は一つの反応相をもつと仮定し、式を用いて解析を行った。測定を行ったすべての波長で式 3-2 で表される理論曲線は実験データとよく一致し、3 分後のスペクトルで表される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることがわかった。次に得られた理論曲線を $t = 0$ に外挿した結果、CD 値は変性状態の値を下回っていた(図 3-11 の丸)。これは、測定の不感時間内にさらに別の反応相が存在していることを示している(3.3.2. 参照)。

LYZ は BLA と相同タンパク質であり、互いによく似た天然構造をもち、アミノ酸配列の相同性も高い。しかし、BLA が変性剤による変性平衡の中でモルテングロビュール状態の存在を示すのに対し、LYZ は協同的な二状態の変性転移を示す(79, 80, 95)。また、BLA が酸性 pH でモルテングロビュール状態となるのに対し、LYZ は酸性 pH でも天然構造が安定でモルテングロビュール状態は観測されない。このような違いがあるがバースト相中間体の構造の特徴は互いによく似ていることが知られている(79, 80)。

フォールディング反応開始 3 分後のスペクトルは以前に酸性溶液中でのフォールディング反応で観測されたバースト相中間体とよく似ていた(図 3-11)(80)。したがって、ゲル中で観測された LYZ の初期中間体は溶液中のバースト相中間体に対応する中間体であると考えられる。その後、CD スペクトルは時間経過とともにゆっくりと天然状態に近づいていった。

3.3. 考察

3.3.1. シリカゲル中でのフォールディング反応の特性

以上の結果より、本研究で用いたすべてのタンパク質のフォールディング速度がシリカゲル中で大幅に遅くなることがわかった。CYT の場合で考えると、溶液中ではフォールディング反応開始後数百マイクロ秒以内に形成される中間体(90, 91)が、ゲル中では 100 秒程度で形成されていることから、 10^6 倍以上遅くなっていると考えられる。

HTL を除くすべてのタンパク質で、溶液中で観測されているバースト相中間体とよく似た CD ス

ペクトルの特徴を示す初期中間体がゲル中で観測された。また、ELGとBLAにおいては、初期中間体と酸変性状態のCDスペクトルが重なることから、溶液中と同様にこれら2つの状態は等価な構造であることが示された(77, 79, 80, 92)。これらの事実は、シリカゲル中においてもフォールディング反応の特性は保持されていることを示唆している。しかし、2章で述べたようにELGとBLAの酸変性状態のスペクトルは溶液中で観測されているものと比べて特徴は保持されているものの、二次構造含有量が減少していることを示した(図 2-2、2-4)。これは中間体が天然状態に比べて安定性が低く、ゲルマトリックスの影響によって不安定化したためだと考えられる。ファネル・モデルでいえば、浅く広いエネルギーの谷間に位置している中間体構造のアンサンブルがゲルマトリックスの影響によりシフトとして捉えることができる。また、スペクトルの特徴が保持しているということは、シリカゲル中と溶液中での中間体構造のアンサンブルの間で共通した構造が保持されていることを表していると考えられる。もし、中間体構造の不安定化が、2.3.1 で述べたように、水の構造化によってもたらされているならば、水の構造化を妨げるような溶質を加えることで、ゲル中でも溶液中と同様のCDスペクトルを示す中間体状態をつくることができるかもしれない。今後の実験で、そのようなリフォールディング緩衝液の条件を検討する必要がある。

一方、HTLではゲル中で観測された初期中間体のCDスペクトルは溶液中で観測されているバースト相中間体のものとは、形状の特徴が異なっており(図 2-3、参考文献 78 の Figure 2A)、二次構造の含有量が少ないことを示していた。HTLの溶液中で観測されているバースト相中間体のCDスペクトルは215nm付近と230nm付近にそれぞれ特徴的な極小と極大を示し、部分的に天然様の β シート構造を持っていることが示唆されている(78)。また、芳香族アミノ酸(96-98)やジスルフィド結合(98, 99)も220~230nm付近に正のCDバンドを生じることが知られている。したがって、溶液中で観測されているCDスペクトルとゲル中のものが異なることから、ゲル中で観測された初期中間体は、ゲルマトリックスの及ぼす影響によって構造が変化している可能性が考えられる。しかし興味深いことに、溶液中では酸変性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にもかかわらず(78)、ゲル中での初期中間体のCDスペクトルは酸変性状態のものとよく一致した。多くのタンパク質でフォールディングの初期中間体が平衡論的に観測されるモルテングロビュー

ルと等価な構造であること(18, 19)と合わせて考えると、観測された中間体はフォールディング反応の初期段階で形成される中間体であると考えられる。また、別の可能性として、ゲル中で観測された HTL の初期中間体は、ゲル中の環境によってフォールディング速度が遅くなった結果みられた β シート構造が形成される以前の中間体であることも考えられる。一般的に、 β シート構造はポリペプチド鎖上、遠位の相互作用によって形成されるため、 α ヘリックスの形成に比べて長い時間がかかると考えられている(100, 101)。あるいは、溶液中で観測されているバースト相中間体は分子間 β シート構造を形成した会合体である可能性も考えられる。今後、溶液中においてもゲル中で観測されたものと同様の初期中間体が存在するのか明らかにされるべきである。

3.3.2. シリカゲル中でのバースト相

本研究で用いたすべてのタンパク質のリフォールディング反応において、測定の不感時間内にさらに速い反応相が存在していることが示された(図 3-3~3-12)。柴山による以前の研究から、CYT の不感時間内の反応は pH の上昇に伴う変性状態中の His18 のヘムへの配位であることがわかっている(61)。一方、ELG、HTL、BLA、LYZ で観測された不感時間内の変化は GdnHCl 濃度の変化に伴って起きる変化であると考えられる。多くのタンパク質で、変性状態の CD 強度は変性剤濃度に対して直線的に変化することが知られている。また、これらの CD 強度の依存性は、変性状態のアンサンブルの分布が変性剤濃度によって変化するために生じると考えられている。一般的に、高濃度変性剤溶液中ではポリペプチド鎖と溶媒間の引力がポリペプチド鎖内の引力を上回るためポリペプチド鎖は広がった構造をとり、逆に、低濃度変性剤溶液、あるいは変性剤を含まない溶液中ではポリペプチド鎖内の引力がポリペプチド鎖と溶媒間の引力より勝るため、ポリペプチド鎖はコンパクトな構造をとる(102-105)。したがって、変性剤濃度に対して傾きをもった変性状態の CD 強度を直線的に 0M に外挿した CD 値は、変性剤非存在下におけるコンパクトに凝縮した変性状態の値であると考えられる。本実験で ELG、HTL、BLA、LYZ に対して観測された、CD の初期値は、以前の研究でそれぞれのタンパク質に対し予想された変性剤非存在下における変性状態の CD 値と近い値であった(222nm において、ELG(77) : -6,000 deg·cm²/dmol、HTL(78) : -3,000 deg·cm²/dmol、BLA(80) : -4,200 deg·cm²/dmol、LYZ(79) : -3,700 deg·cm²/dmol)。したがって、ゲ

ル中で観測された CD 値の不感時間内の変化($U \rightarrow U'$)は、変性剤濃度の減少によるポリペプチド鎖の凝縮を反映しているのかもしれない。今後、このこと確認するためには蛍光プローブや X 線小角散乱法などを用いて直接、分子半径の変化を観測する必要がある。また、ジスルフィド結合や芳香族アミノ酸も遠紫外領域の CD に寄与することが知られているので(96-98)、 $U \rightarrow U'$ の CD 値の変化はこれらアミノ酸の周辺での構造変化やタンパク質内部への埋没も同様に寄与している可能性がある。

3.3.3. フォールディング初期段階のキネティクス

3.3.2 で述べたように、観測されたフォールディングの初期反応は変性状態(U')から始まっていることが示唆された。したがって、それに引き続く単一の指数関数で表される速度過程は U' からフォールディング初期中間体への転移反応であると考えられる($U' \rightarrow I$)。一般的に、自由エネルギー障壁によって隔てられた二状態間の転移の速度過程は単一指数関数で表される。したがって、本実験の結果は、フォールディング初期中間体が変性状態と自由エネルギー障壁によって隔てられた状態であることを示している。しかし、理論的な研究からは、エネルギー障壁のないフォールディング反応(ダウンヒル・フォールディング)においても、エネルギー障壁をもつフォールディング反応と同様に単一指数関数的な速度過程が観測される可能性が指摘されており、速度過程のみからこれらを見分けることが難しいことが示されている(106)。

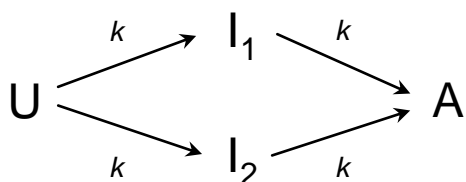
ここで一つ注意しておきたいことは、今回 BLA で観測されたリフォールディング反応 (図 3-10(a))と、図 3-1 で示したシリカゲルからの GdnHCl の拡散が互いに似た時間で起きていることである。この結果は、観測されたリフォールディング反応曲線が、ゲルからの GdnHCl の拡散を反映している可能性を示唆する。仮にそうであるとするならば、それぞれのタンパク質で観測されたリフォールディング反応曲線の速度定数や 5 章で示す初期反応の活性化エネルギーの値は一致するはずである。しかし、実際にはリフォールディング反応の速度定数や初期反応の活性化エネルギーの値はそれぞれのタンパク質で異なっていた。また、BLA 以外のタンパク質では観測されたリフォールディング反応の時間は GdnHCl の拡散よりも長かった(図 3-4(a)、3-6(a)、3-8(a)、3-12(a))。これらのことから、今回観測された指数関数で表される反応曲線はリフォールディング反応を反映

していると考えられる。もちろん、完全には GdnHCl の拡散を反映している可能性を除外できないため、今後ゲルを薄くしたり、スターラーを用いるなど拡散時間を短くするための工夫をして実験を行いたい。

3.3.4. 初期中間体における二次構造形成

BLA および ELG では、プロリン変異導入によって酸変性状態中の二次構造が部位特異的に壊れることが報告されている(93, 107)。また、BLA の酸変性状態が非協同的に壊れることが NMR を用いた実験からわかっている(87, 108)。これらの事実は、中間体の形成には複数の経路が存在することを示唆している。一般的にフォールディング経路に複数の経路が存在する場合、観測される反応は複数の指数関数からなる速度過程となるため、本研究において初期中間体の形成が単一指数関数的な速度過程として観測された結果と矛盾しているようにみえる。この矛盾を説明する一つの例として、初期中間体中の二次構造の形成速度がすべて同じである可能性が考えられる。

まず簡単のために、フォールディング反応において初期中間体(A)が以下のように2つの経路を通過して形成されると考える。



ここで、U は二次構造をもたない変性状態、I₁と I₂は A の二次構造をそれぞれ相補的に(例えば I₁は A の二次構造を 30%、I₂はそれ以外の 70%を)形成している中間体である。このとき、速度式は以下のように表される。

$$-\frac{d(U)}{dt} = 2k(U) \quad (\text{式 3-3})$$

$$\frac{d(I_1)}{dt} = k(U) - k(I_1) \quad (\text{式 3-4})$$

$$\frac{d(I_2)}{dt} = k(U) - k(I_2) \quad (\text{式 3-5})$$

$$\frac{d(A)}{dt} = k(I_1) + k(I_2) \quad (\text{式 3-6})$$

$$(U) + (I_1) + (I_2) + (A) = 1 \quad (\text{式 3-7})$$

これらの速度式の解は以下のようになる。

$$(U) = e^{-2kt} \quad (\text{式 3-8})$$

$$(I_1) = (I_2) = e^{-kt}(1 - e^{-kt}) \quad (\text{式 3-9})$$

$$(A) = 1 + e^{-kt}(e^{-kt} - 2) \quad (\text{式 3-10})$$

A の CD 強度を $[\theta]$ とすると、CD 強度は各状態で形成されている二次構造の量に比例するため、I1 と I2 の CD 強度はそれぞれ 0.3 $[\theta]$ 、0.7 $[\theta]$ で与えられる。すると、ある時間 t で観測される CD 強度 $[\theta]_{\text{obs}}$ は、

$$\begin{aligned} [\theta]_{\text{obs}} &= 0.3[\theta](I_1) + 0.7[\theta](I_2) + [\theta](A) \\ &= 1 - e^{-kt} \end{aligned} \quad (\text{式 3-11})$$

となり、A の形成が単一指数関数的な速度過程として表されることが予想される。

以前の研究では CYT のシリカゲル中でのリフォールディング反応において初期中間体の形成過程を式 3-1 を用いて解析した結果、CD を用いて観測した場合は β は 1 に近い値を示したのに対し、蛍光や吸光度の変化で観測した場合 β は有意に 1 よりも小さい値であった(61)。また溶液中の実験でも、低温条件下(-35 から 5 °C)で CYT と LYZ のフォールディング初期段階の蛍光変化が引き延ばされた指数関数として観測されている(109)。これは、リフォールディング反応における構造変化に伴った蛍光や吸光度の変化が直線的でないためではないかと考えられる。例えば、蛍光のエネルギー移動効率 β はエネルギーを受け渡すドナー分子とエネルギーを受け取るアクセプター分子間の距離の 6 乗に反比例する。したがって、リフォールディング反応における蛍光強度はドナー分子とアクセプター分子間の距離が短くなると急激に減少すると考えられる。特にフォールディング初期段階のように分子半径の変化が著しい反応では、このような現象がみられると考えられる。さらにシリカゲル中や低温条件下でフォールディング反応速度が遅くなっている場合、よ顕著になると考えられる。

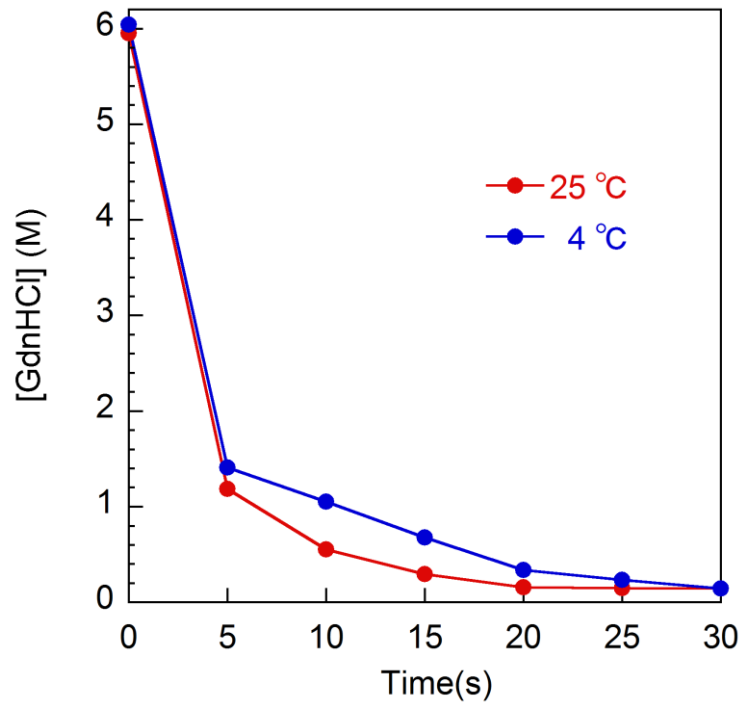


図 3-1. シリカゲルからの GdnHCl の拡散測定

各時間での GdnHCl 濃度 は 207.5nm での UV 吸収から求めた。GdnHCl の拡散は図 3-2 のように組み立てたセル内に 3.6 ml の DW を注ぐことで開始した。最初の 5 秒間はピペッティングを行い、UV 吸収の測定時は図 2-1(b)のように石英プレートでカバーした。

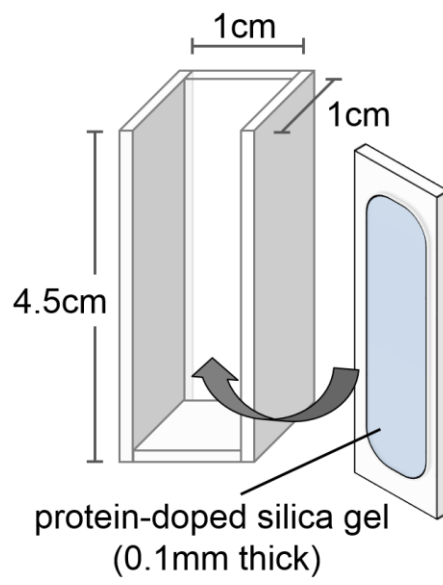


図 3-2. 石英 3 面セルの模式図

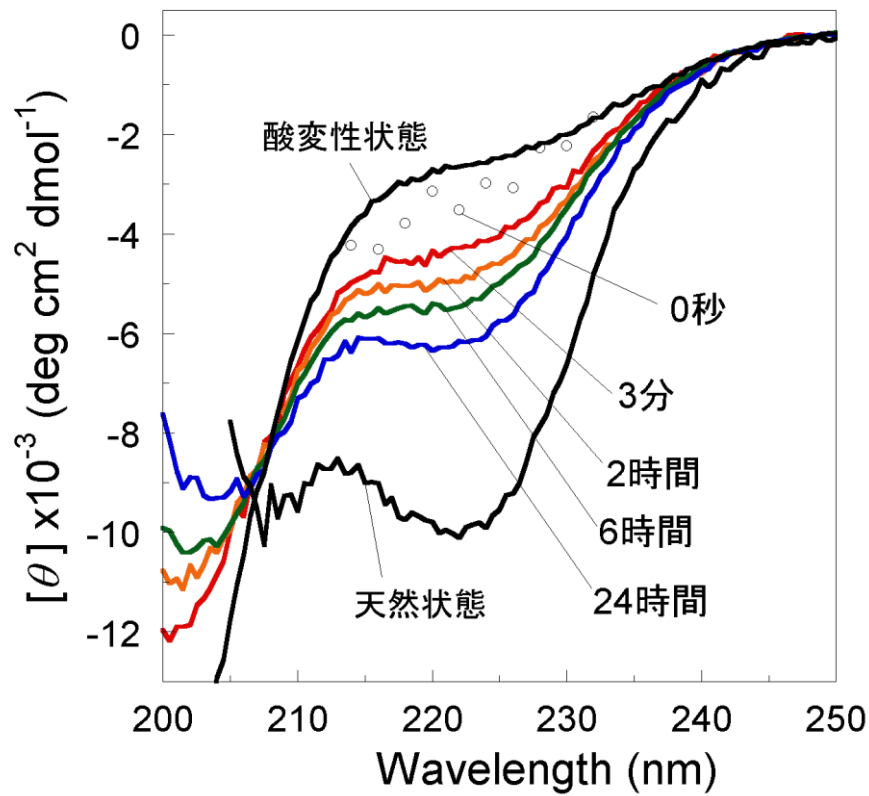


図 3-3. CYT のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化

0.2M リン酸 (pH1.8、25°C) で酸変性させた後、0.5M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.5、25°C) でリフォールディングを行った。

0 秒の CD 値は各波長で観測したリフォールディング反応曲線から求めた。

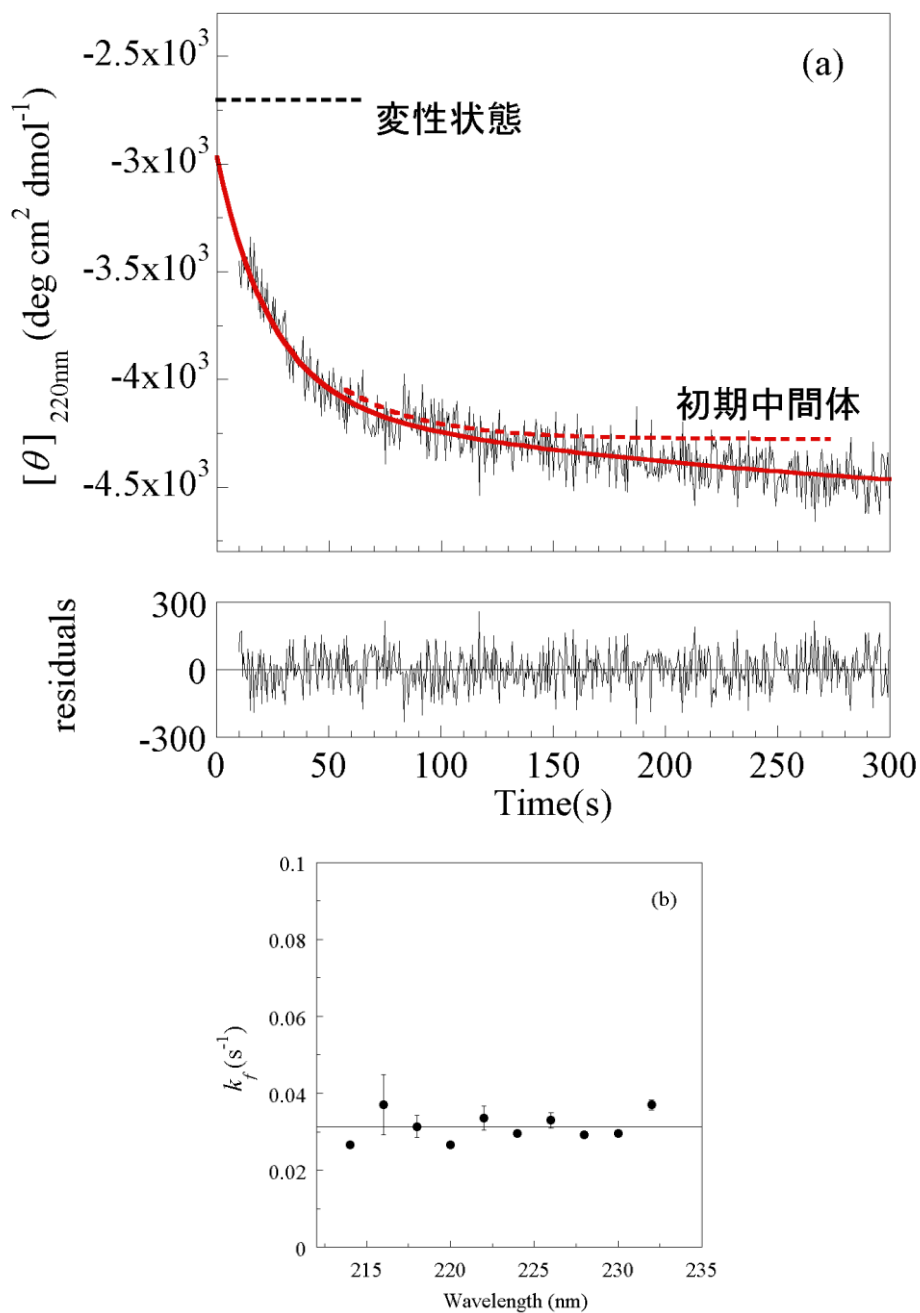


図 3-4. (a) CYT のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差(下)

10 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。

理論曲線は式 3-1 を用いた解析から得られた(β は 1 に固定)。

(b) 各波長で観測されたリフォールディング初期反応の速度定数

各波長で観測された速度定数 k_f を丸で示した。水平線は速度定数の平均値を表す。

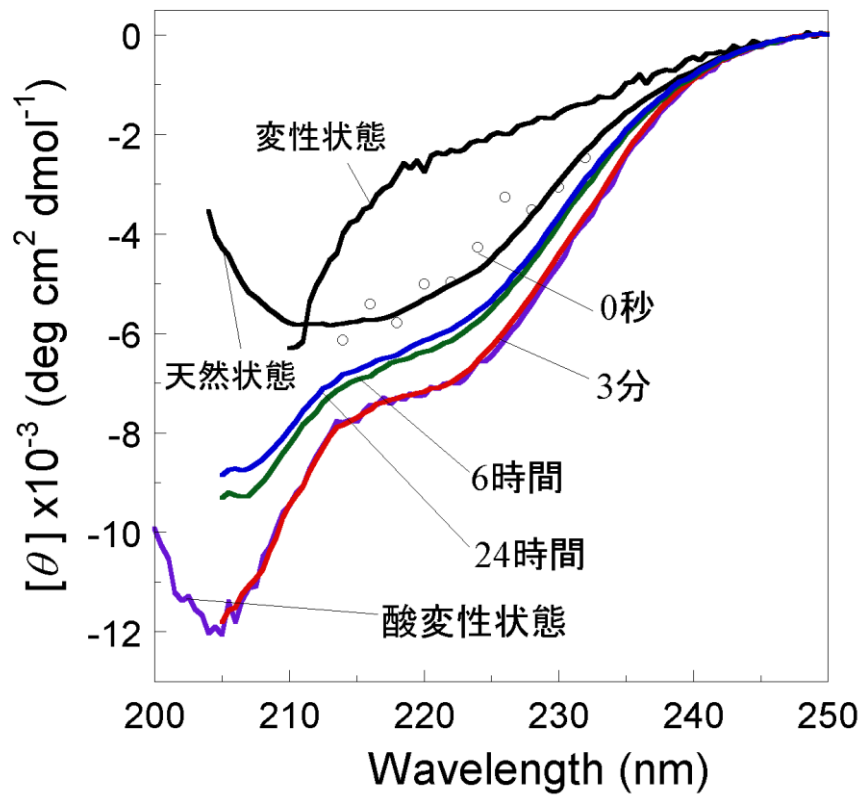


図 3-5. ELG のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化と酸変性状態の CD スペクトル

リフォールディングは 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2、25°C)、変性は 6M GdnHCl、1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2、25°C) で行った。酸変性状態 (0.2M リン酸、pH 1.8) は紫色で示した。0 秒の CD 値は各波長で観測したリフォールディング反応曲線から求めた。

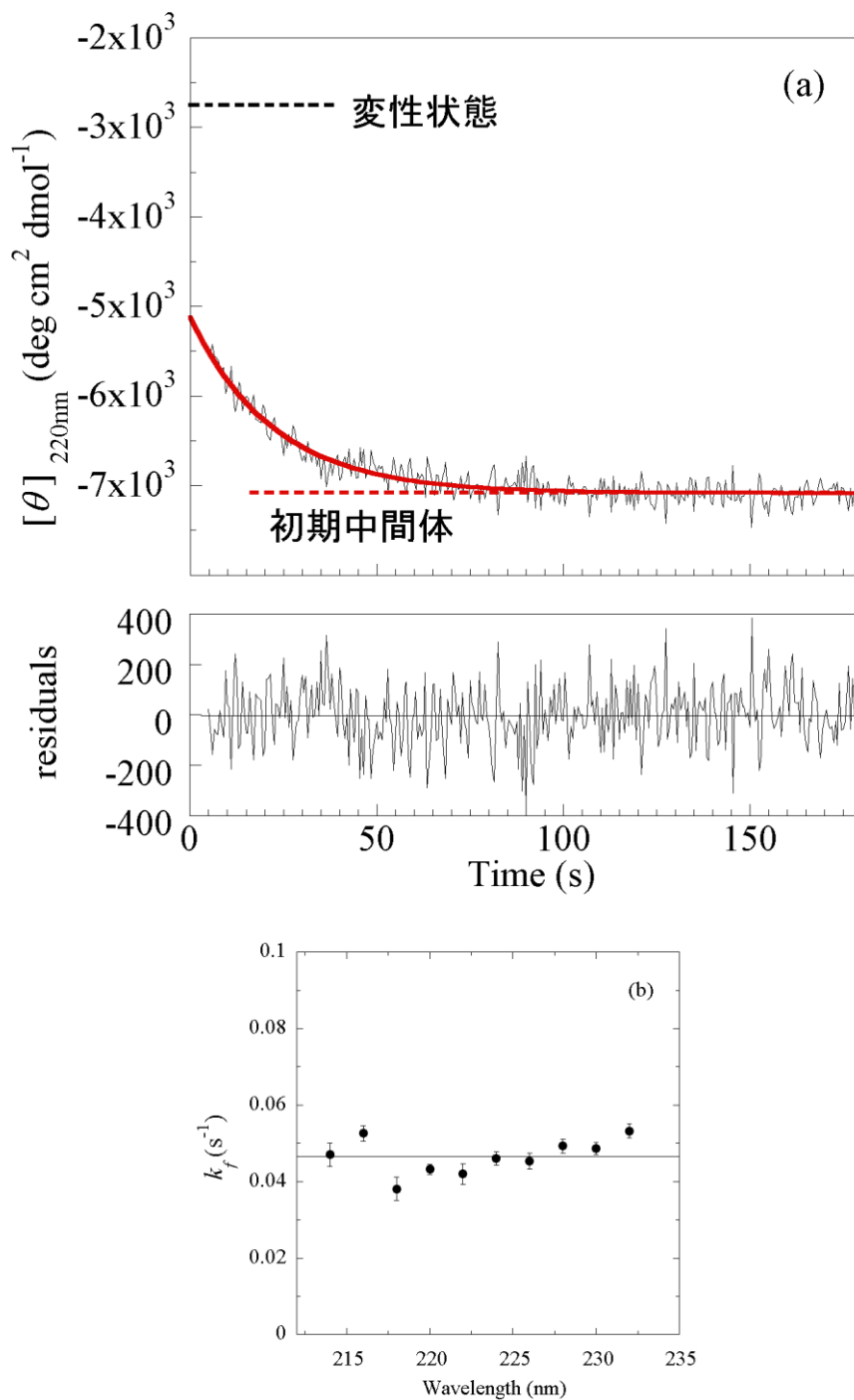


図 3-6. (a) ELG のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差 (下) 5 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。
 (b) 各波長で観測されたリフォールディング初期反応の速度定数
 各波長で観測された速度定数 k_f を丸で示した。水平線は速度定数の平均値を表す。

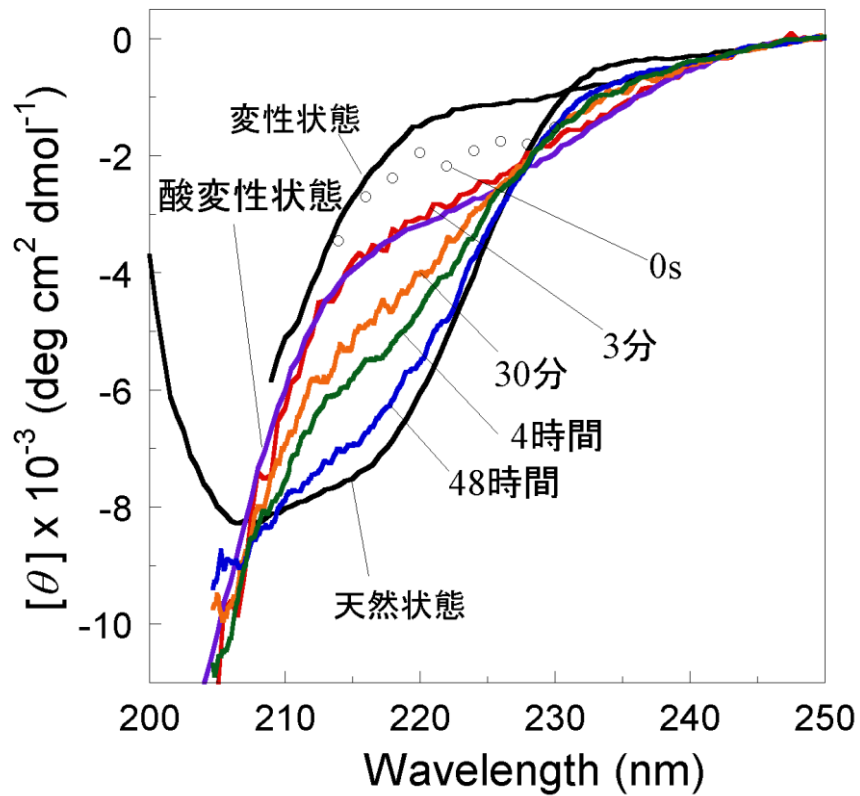


図 3-7. HTL のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化と酸変性状態の CD スペクトル

リフォールディングは 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0、25°C)、変性は 6M GdnHCl、0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0、25°C) で行った。酸変性状態 (0.2M リン酸、pH 1.8) は紫色で示した。0 秒の CD 値は各波長で観測したリフォールディング反応曲線から求めた。

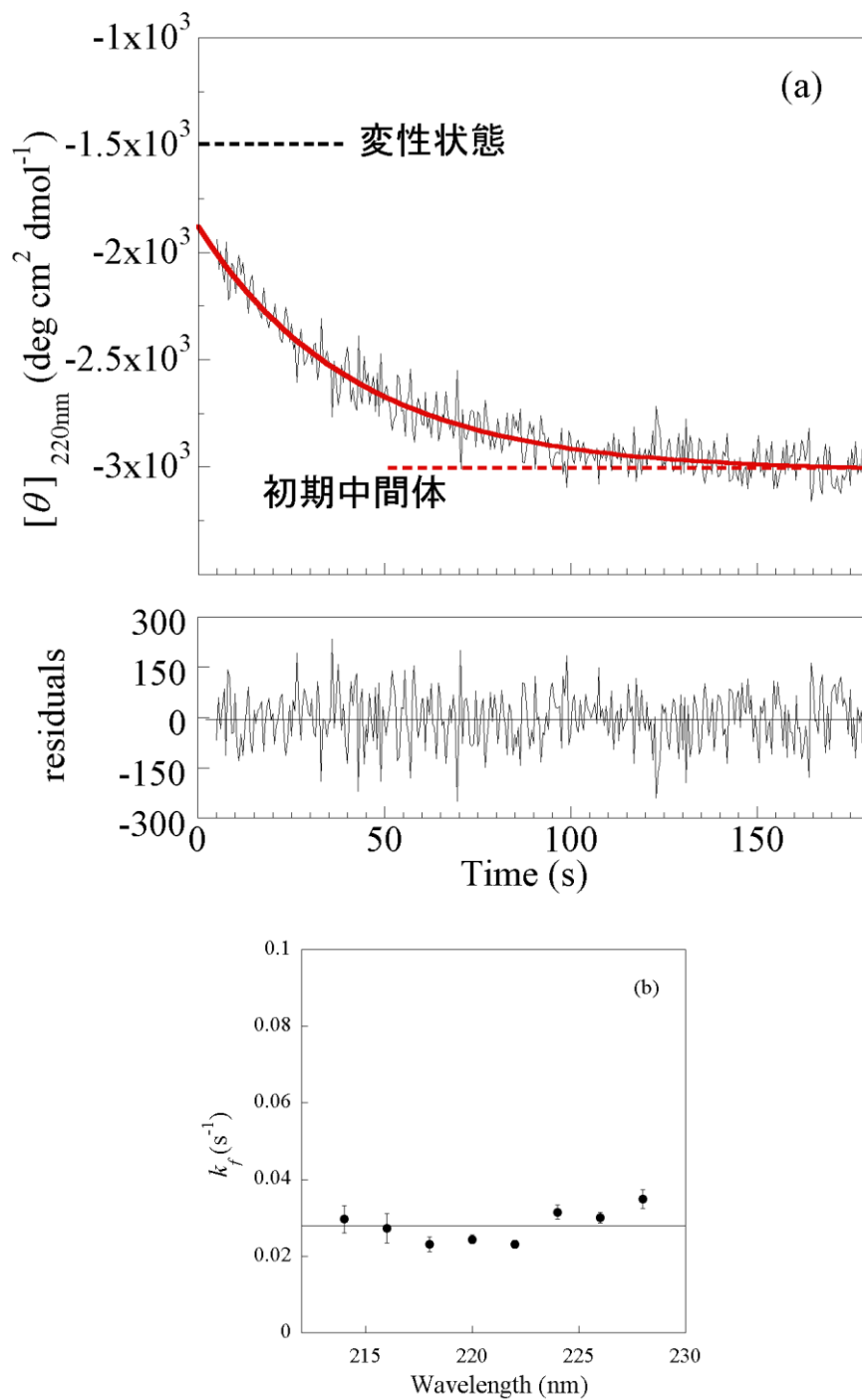


図 3-8. (a) HTL のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差 (下) 5 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。
 (b) 各波長で観測されたリフォールディング初期反応の速度定数
 各波長で観測された速度定数 k_f を丸で示した。水平線は速度定数の平均値を表す。

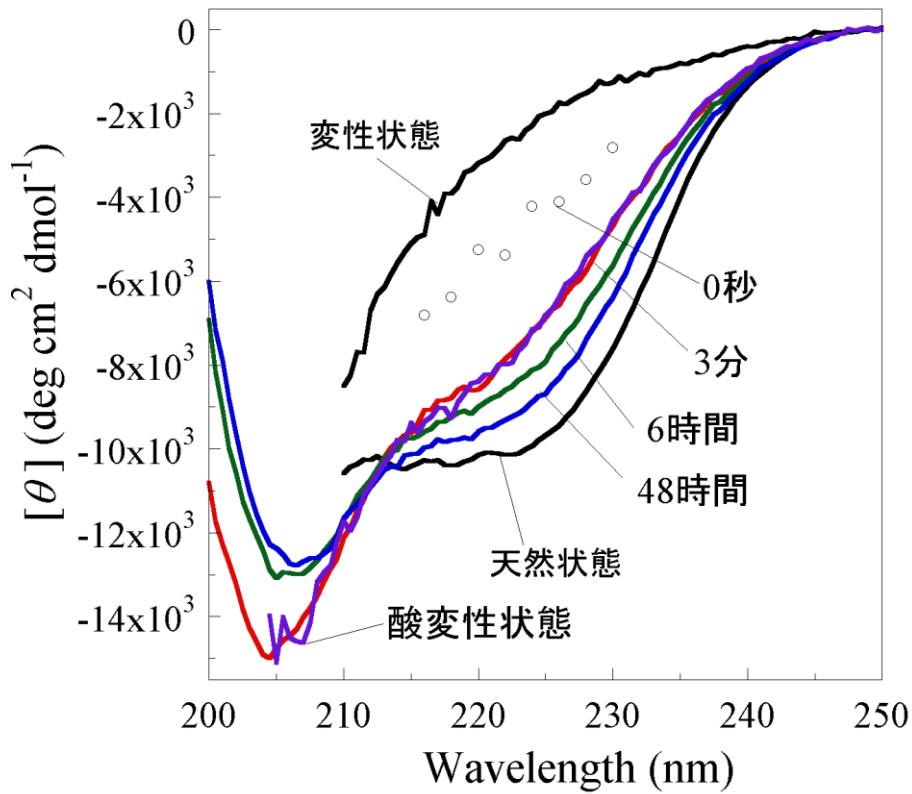


図 3-9. BLA のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化と酸変性状態の CD スペクトル

リフォールディングは 0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0、25°C)、変性は 6M GdnHCl、0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0、25°C) で行った。酸変性状態 (0.2M リン酸、pH 1.8) は紫色で示した。

0 秒の CD 値は各波長で観測したリフォールディング反応曲線から求めた。

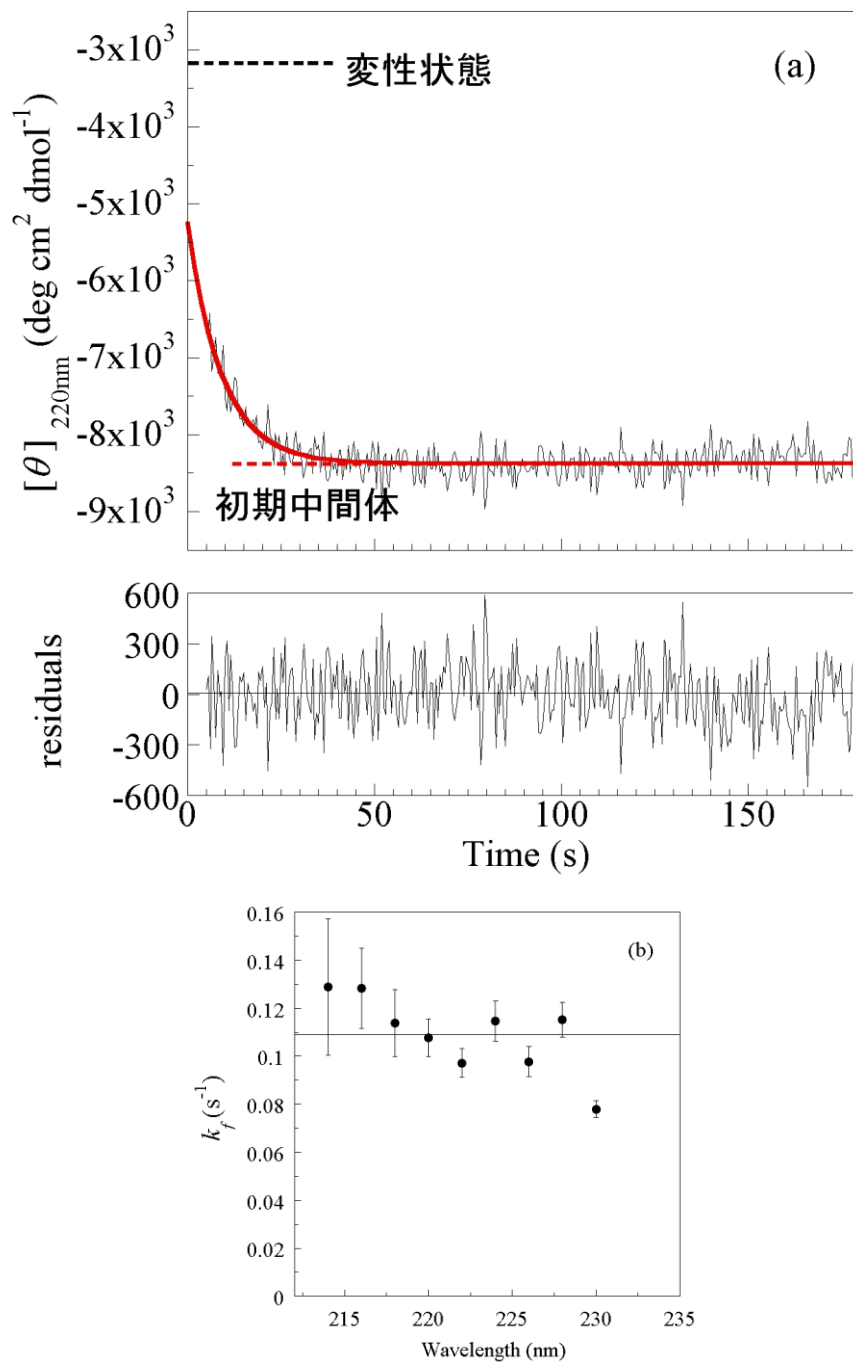


図 3-10. (a) BLA のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差 (下)

5 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。

(b) 各波長で観測されたリフォールディング初期反応の速度定数

各波長で観測された速度定数 k_f を丸で示した。水平線は速度定数の平均値を表す。

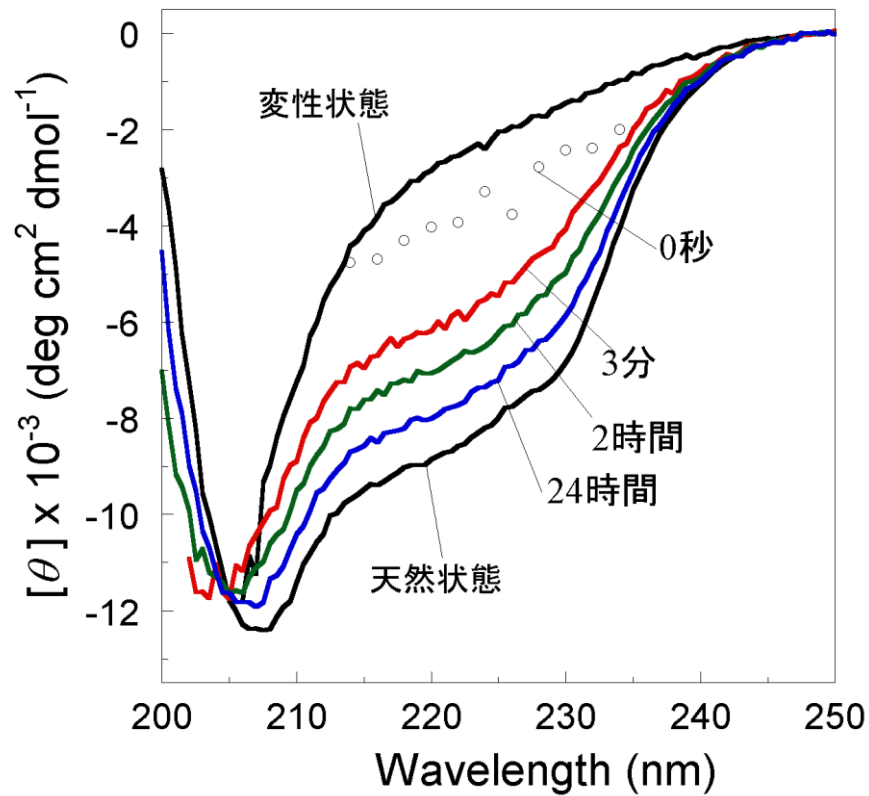


図 3-11. LYZ のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化

リフォールディングは 0.2M リン酸 (pH 1.8、25°C)、変性は 6M GdnHCl、0.2M リン酸溶液 (pH 1.8、25°C) で行った。

0 秒の CD 値は各波長で観測したリフォールディング反応曲線から求めた。

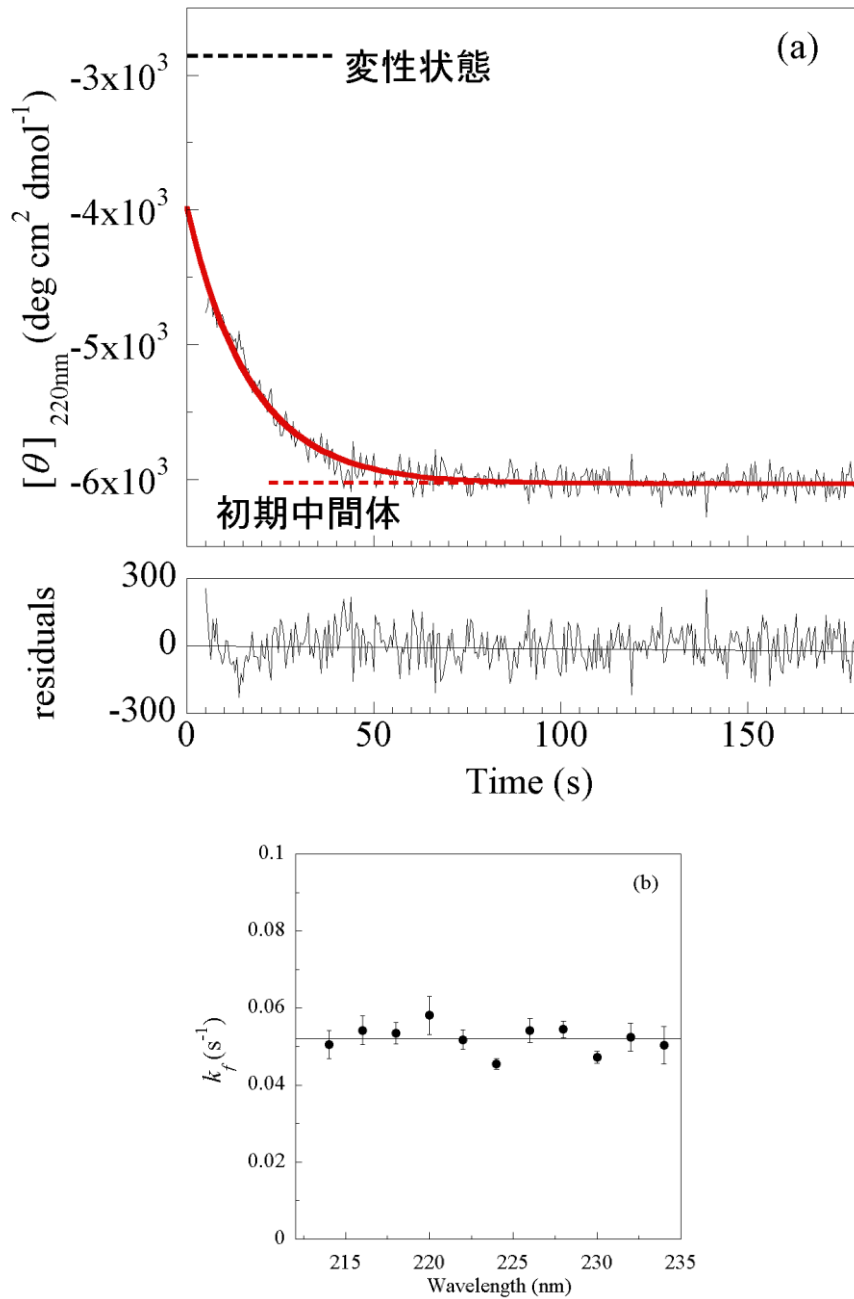


図 3-12. (a) LYZ のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差 (下)

5 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。

(b) 各波長で観測されたリフォールディング初期反応の速度定数

各波長で観測された速度定数 k_f を丸で示した。水平線は速度定数の平均値を表す。

4 章 ELG 変異体 A123T のシリカゲル中でのフォールディング反応

3 章で述べた初期中間体における二次構造形成モデルが妥当であるかを検証するために、ELG の初期中間体中の非天然 α ヘリックスを不安定化するように設計した変異体を作製し、その初期中間体形成速度をシリカゲル中で調べることにした。もし上記のモデルが正しいければ野生型と変異体で観測される初期中間体の形成速度は同じになると期待される。

ELG のプロリン置換変異体を用いた酸変性状態の構造の研究から、これらの非天然の α ヘリックスは、天然構造における H スtrandから α ヘリックスの N 末端をつなぐ領域に形成することがわかっている(93)。本実験ではこの非天然 α ヘリックスを特異的に破壊するために、ヘリックス形成傾向の高い 123 番目の Ala を β シート形成傾向の高い Thr に置換した変異体 A123T を作製した。A123T の安定性は溶液中での尿素変性転移によって測定した。さらに、フォールディング初期段階の二次構造形成のモデルについて知見を得るために、A123T のシリカゲル中でのフォールディング反応を観測し、野生型の結果と比較した。

4.1. 方法

4.1.1. 変異体 A123T の発現、精製

変異体 A123T の発現菌体は以前中川によって作製されたものを使用した。-80°C で冷凍保存しておいた A123T の発現菌体を 40ml の LB/Amp に懸濁し、37°C、130rpm でオーバーナイトで振盪培養した。その後、全量の培養液と 16ml の 100mM のイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を 4l の LB/Amp に加えて、37°C、130rpm でオーバーナイトで振盪培養した。培養液を 4°C で 4500rpm で 10 分間遠心し集菌した。集菌した菌体はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、200ml の PBS を加えて、超音波で破碎した。破碎液を 4°C、12,000rpm で 10 分間遠心し、沈殿を回収した。回収した沈殿に PBS 9ml、10% Triton X-100 を 1ml 加え懸濁し、4°C、9000rpm で 15 分遠心し、上澄みを取り除いた。この操作を 2 回繰り返し、遠心後の沈殿を 8M Urea/50mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁した。懸濁を 9000rpm、20°C、15min 遠心し、上澄みを 500ml の Refolding buffer (50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5mM ヒドロキシエチルジスルフィド (HED)、5mM β -メルカプトエタノール (β -ME) (nacalai tesque)) に希釈した。希釈後、室温で 1 時間ゆるやかに攪拌した。この溶

液を 50mM Tris-HCl(pH8.0)で平衡化した DEAE-sepharose にアプライし、0~0.3M の NaCl のグラジエントをかけ溶出した。A123T を含むフラクションを回収し DW で透析後、透析液に NH_4HCO_3 を 5mM になるように加え、同じく 5mM NH_4HCO_3 で平衡化した Sephacryl S-100 カラムに 4°C 下でアプライし、溶出した。A123T を含むフラクションを回収し、Tris-HCl を 20mM、pH8.0 になるように加えて、20mM Tris-HCl (pH8.0)で平衡化した Q sepharose にアプライした。0~0.5M NaCl のグラジエントをかけて溶出し、A123T を含むフラクションを回収して、DW で透析を行った。透析後、真空凍結乾燥機で凍結乾燥し、-30°C で保存した。精製後のタンパク質の純度は、逆相 HPLC、SDS-PAGE、Native-PAGE を用いて確認した。

4.1.2. A123T の尿素変性転移

A123T の安定性を調べるために溶液中での尿素変性転移を行い、その結果を以前に藤原らによって得られた野生型の尿素変性転移の結果と比較した。尿素変性転移は 0M から 6M の尿素を含む 50mM ギ酸カリウム緩衝液(pH4.0、25°C)中での CD スペクトルを測定することで調べた。可逆性の確認は天然状態から変性状態への転移と逆方向の転移の値が一致していたことから確認した。尿素濃度は、アツベ屈折計(Shimadzu)を用いて決定した。また、タンパク質濃度は A123T の吸光係数を野生型と同じ $\epsilon_{280} = 12,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ として UV 吸収スペクトルから算出した。293nm と 222nm の測定値を尿素濃度に対してプロットした。

4.1.3. A123T のシリカゲルへの封入およびリフォールディング反応の測定

A123T のシリカゲルへの封入、変性反応、CD の測定は野生型と同様に行った(2、3 章参照)。また、リフォールディング反応は 25°C で、野生型と同様の条件で行った(3 章参照)。

4.2. 結果

4.2.1. A123T の安定性の評価

溶液(50mM ギ酸カリウム緩衝液(pH4.0、25°C))中における近紫外(250 から 350nm)と遠紫外(200 から 250nm)の CD スペクトルは野生型のもので非常に一致した(図 4-1)。このことから、A123T の天然構造は野生型と同様であることがわかった。293nm と 222nm によって測定した尿素

による変性転移曲線を図 4-2 に示した。293nm での測定結果は、二状態的な転移であったのに対し、222nm で測定した場合、3.5M 付近の尿素濃度で天然状態よりも大きな CD 強度がみられたことから、非天然の α ヘリックスをもつ中間体が蓄積することが示された。したがって、転移は天然状態、中間体状態、変性状態の三状態転移と仮定し、293nm と 222nm で観測した転移曲線を以下の式(4-1)を用いて、グローバル・フィッティング解析し、熱力学的なパラメーターを得た。

$$\theta_{\text{obs}} = \frac{\theta_N \exp\{(\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{NU}}c)/RT\} + \theta_I \exp\{(\Delta G_{\text{IU}}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{IU}}c)/RT\} + \theta_U}{1 + \exp\{(\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{NU}}c)/RT\} + \exp\{(\Delta G_{\text{IU}}^{\text{H}_2\text{O}} - m_{\text{IU}}c)/RT\}} \quad (\text{式 4-1})$$

ここで、 θ_{obs} は観測される CD 値で、 θ_N 、 θ_I 、 θ_U はそれぞれ天然状態、中間体状態、および変性状態状態における CD 値である。 $\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ および $\Delta G_{\text{IU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ はそれぞれ天然状態 \leftrightarrow 変性状態、中間体状態 \leftrightarrow 変性状態間の自由エネルギーの差で、 m_{NU} 、および m_{IU} はそれぞれ $\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ と $\Delta G_{\text{IU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ の変性剤濃度依存であるとともに、転移の協同性を表す指標である。また、222nm における θ_U は尿素濃度 c に対して直線的な依存性を示すと仮定され、以下の式 4-2 ように表される。

$$\theta_U = \theta_U^{\text{H}_2\text{O}} + \Delta\theta_U \times c \quad (\text{式 4-2})$$

$\theta_U^{\text{H}_2\text{O}}$ は変性剤非存在下における変性状態の CD 値で $\Delta\theta_U$ は尿素濃度 c に対する依存を表す。得られた A123T の熱力学的パラメーターと以前に得られている野生型とものを表 4-1 にまとめて示した。A123T の $\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ は野生型に比べて小さくなっていることから、天然状態の安定性が変異によって低くなっていることがわかった。一方、中間体状態の安定性では、大きな変化はみられなかった。

4.2.2. シリカゲル中での A123T の構造

シリカゲル中での A123T の天然状態、酸変性状態、および変性状態 CD スペクトルと、野生型のスペクトルと比較した(図 4-3)。その結果、観測された A123T の天然条件下の CD スペクトルはわずかな違いはみられたものの、野生型の天然構造のスペクトルとよく一致した。これらの結果から、A123T は野生型と同様の天然構造を保っていることが確認された。わずかなスペクトルの違いは A123T の天然状態の安定性が変異によって野生型に比べ低下したためだと考えられる(表 4-1)。一方、A123T の酸変性状態の CD スペクトルは 220nm 付近の強度が野生型に比べて大きく減少し、200nm 付近の強度が増加していた。また、220nm の CD 値は天然状態と近い値であった。したがって、A123T では、酸変性状態 H スtrand領域に形成される非天然 α ヘリックスが変異によって壊れていることが示された。また、変性剤による変性では、CD スペクトル結果から、A123T は野生型と同様に変性していることが示された。

4.2.3. シリカゲル中での A123T のフォールディング反応

A123T のフォールディング反応は GdnHCl 濃度を 6M から 0M へジャンプさせることで誘起した。図 4-4 にフォールディング反応開始後 5 秒から 3 分までの CD 強度の変化を示す。また、3 分後の CD スペクトルを図 4-5 に示した。

観測されたリフォールディング反応曲線は一つの反応相をもつと仮定し、野生型と同様に式 3-2 を用いて解析を行った。観測された反応曲線はこの理論曲線とよく一致し、求められた速度定数は野生型と非常に近い値であった(野生型 : $4.65 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、A123T : $4.14 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)。また、3 分後のスペクトルで表される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることがわかった(図 4-4)。さらに、野生型でも示されたように、リフォールディング反応開始 3 分後の CD スペクトルはゲル中の酸変性状態のものと一致していた(図 4-5)。したがって、ゲル中で観測された A123T の初期中間体は酸変性状態と等価な構造であることが示された。また、このことは速度論的に形成される非天然 α ヘリックスが H スtrand領域に形成されていることを明らかにしている。

4.3. 考察

本実験の結果、ELGの初期中間体において非天然 α ヘリックスがHストランド領域に形成されることが明らかになった。また、野生型とA123Tで観測されたフォールディング初期段階の速度は互いに近い値であった。このことは、初期中間体における二次構造要素の形成は互いに非協同的に起こるにも関わらず近い速度定数をもっていることを示唆しており、3章で示した初期中間体における二次構造形成のモデルの妥当性に実験的な根拠を与えらる。また、A123Tが可逆的に野生型と同様の天然構造にリフォールディングすることから、ELGで形成される非天然 α ヘリックスはフォールディング反応において必須ではないこと示された。同じクリポカリンファミリーに属するHTLが非天然 α ヘリックスを形成せずに、しかもELGよりもすばやくフォールディングすることが塚本らによる実験から明らかになっており(78)、同様の可能性が示されている。

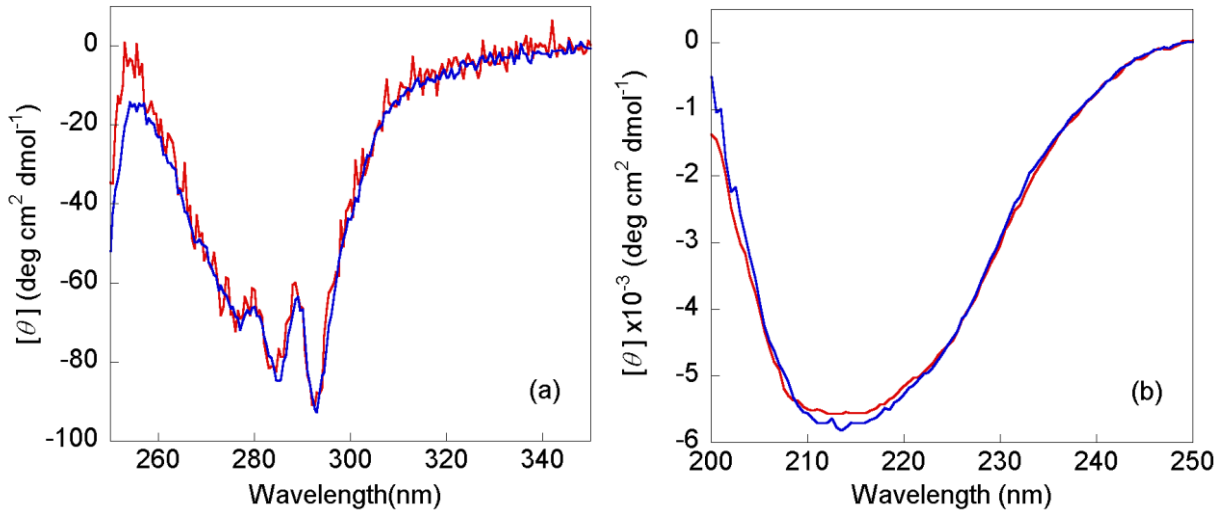


図 4-1. A123T と野生型の天然状態における、(a)近紫外および(b)遠紫外 CD スペクトル
 野生型のスペクトルを青、A123T のスペクトルを赤で示した。
 測定条件は 50mM ギ酸カリウム緩衝液(pH4.0、25°C)である。

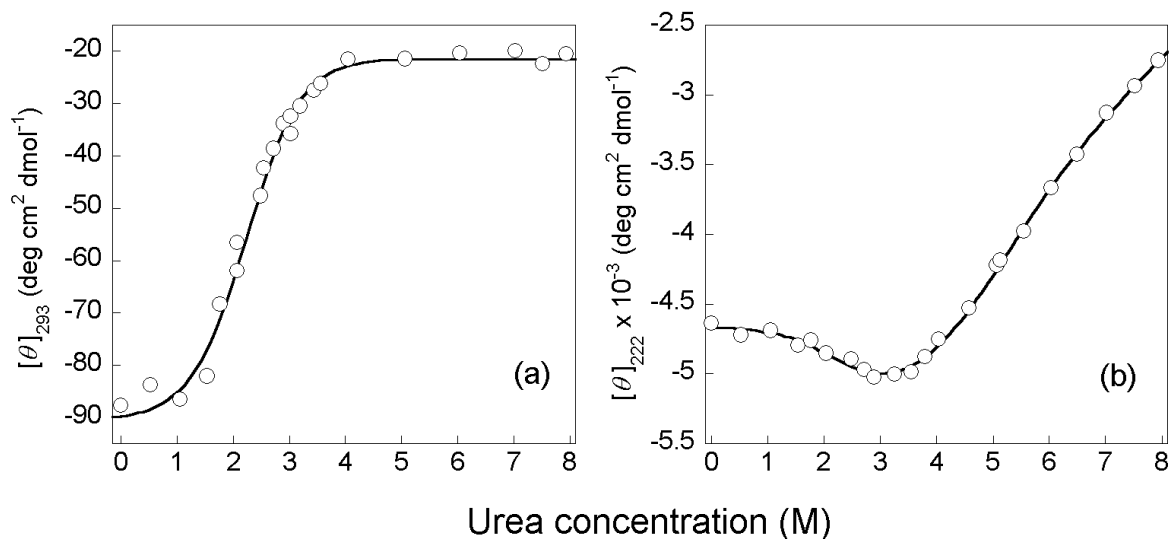


図 4-2. A123T の(a)293nm と(a)222nm の CD によって測定した尿素変性転移

実線は式 4-1 によるフィッティング曲線。算出した熱力学的パラメーターは表 4-1 に示した。

表 4-1. 変性転移曲線から求めた熱力学的パラメーター

	$\Delta G_{\text{NU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)	m_{NU} [kcal/(mol·M)]	$\Delta G_{\text{IU}}^{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)	m_{IU} [kcal/(mol·M)]
A123T	5.94 ± 0.74	1.90 ± 0.21	3.30 ± 0.72	0.73 ± 0.20
WT ^a	9.83 ± 1.27	2.90 ± 0.31	2.90 ± 1.09	0.74 ± 0.21
WT ^b	10.06 ± 0.93	4.74 ± 0.44	3.92 ± 0.74	1.54 ± 0.28

^a 尿素による野生型の変性転移実験から算出された値(77)

^b グアニジン塩酸塩による野生型の変性転移実験から算出された値(77)

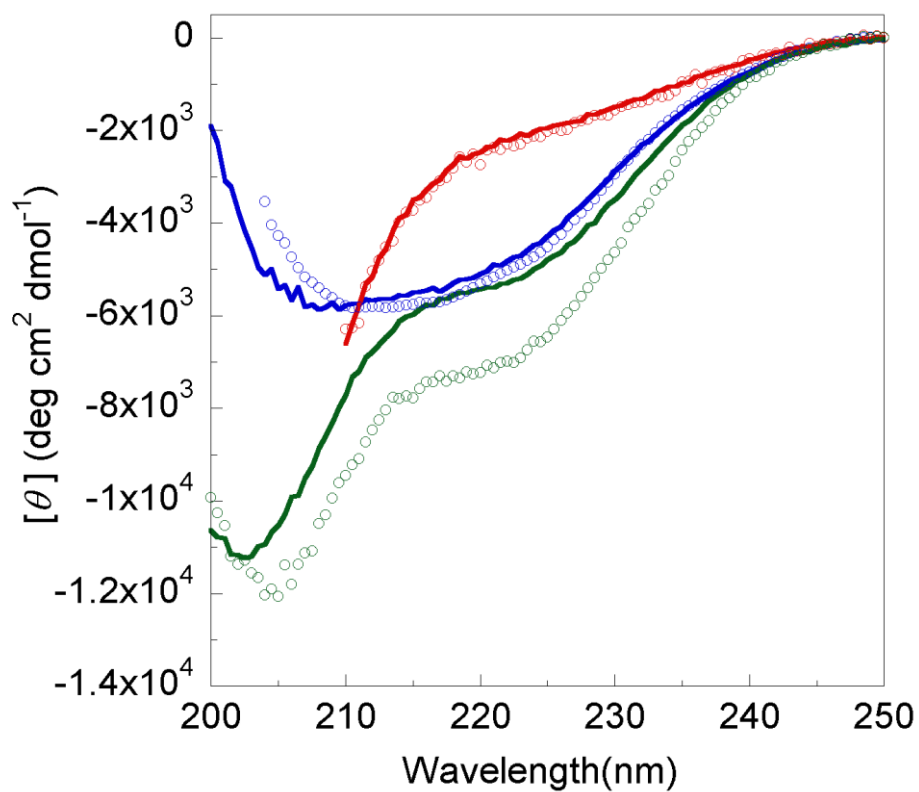


図 4-3. シリカゲル中における A123T と野生型の遠紫外 CD スペクトル

A123T でのスペクトルは実線、野生型のスペクトルは丸印で表した。

天然状態(青色)は 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.2)、変性状態(赤色)は 6M GdnHCl、1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 4.2)、酸変性状態(緑色)は 0.2M リン酸 (pH 1.8) で測定した。

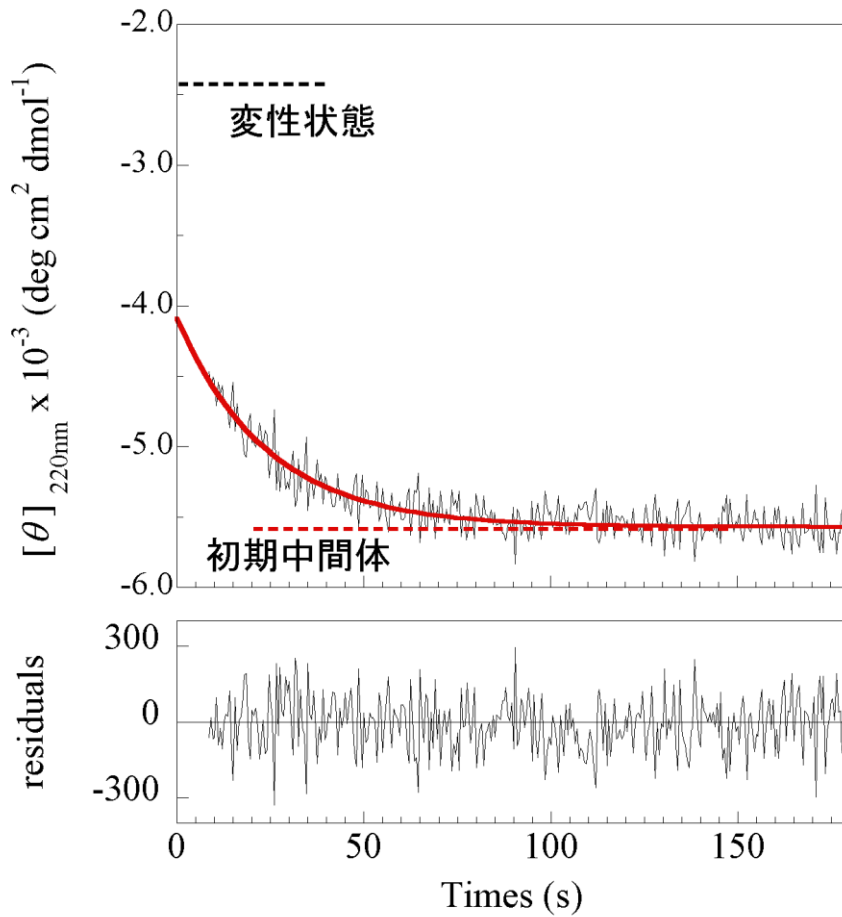


図 4-4. A123T のゲル中でのリフォールディング反応曲線(上)と理論曲線からの残差 (下)
 5 秒から 3 分までの反応を 220nm の CD 強度の変化で観測した。
 リフォールディングは 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2、25°C) で行った。

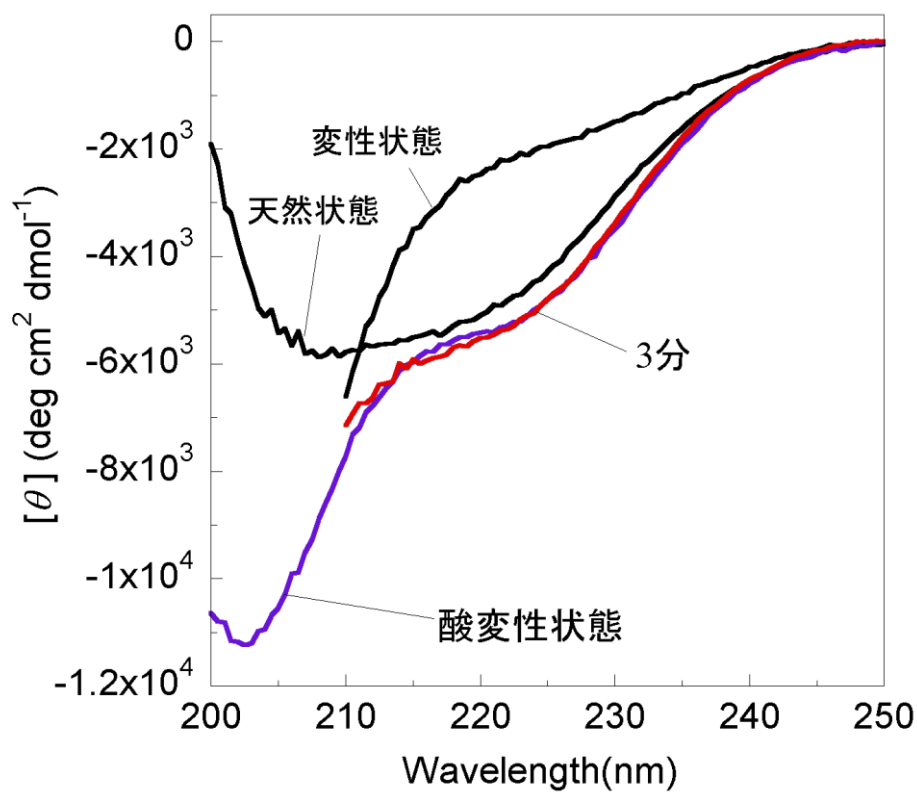


図 4-5. A123T のゲル内でのリフォールディング反応における CD スペクトルの時間変化と酸変性状態の CD スペクトル

リフォールディングは 1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2、25°C)、変性は 6M GdnHCl、1M リン酸カリウム緩衝液 (pH4.2、25°C) で行った。酸変性状態は 0.2M リン酸(pH 1.8)で測定した。

5章 アレニウス・プロットによるフォールディング初期段階の活性化エネルギーの解析

3章の実験から、シリカゲル中でのタンパク質のフォールディング速度が溶液中に比べて非常に遅くなることが示された。その結果、すべてのタンパク質で従来溶液中ではバースト相としてとらえることのできなかつたフォールディング初期段階(U' → I)の速度過程をとらえることができた。また、それらの反応が単一指数関数として表されることから、U' → Iの間にエネルギー障壁が存在していることが示唆された。本実験ではさらに、フォールディング初期段階における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。

5.1. 方法

5.1.1. 温度別リフォールディング実験

ゲル試料の作製および、変性反応、CDの測定は2、3章と同様に行った。リフォールディング反応は5°Cから25°Cの間で行った。CD220nmで観測した5秒から300秒までの反応曲線を3章と同様の理論曲線を用いて解析し、それぞれの温度でのU' → Iの速度定数を算出した。

5.1.2. アレニウス・プロット

アレニウスの式を以下に示す。

$$\ln k = -\frac{Ea}{RT} + \ln A \quad (\text{式 5-1})$$

ここで、 k は絶対温度 T (K)で観測された反応速度、 Ea は反応の活性化エネルギー、 A は温度に依存しない前指数因子、 R は気体定数(=8.314×10⁻³ [kJ/K/mol])である。この式に従って、それぞれの温度で算出されたU' → Iの速度定数の対数、を T の逆数に対してプロットし、得られた直線の傾き $-Ea/R$ から活性化エネルギーを算出した。

5.2. 結果

5.2.1. シリカゲル中におけるフォールディング初期段階の活性化エネルギー

まず、シリカゲル中で算出される活性化エネルギーが、ゲルの条件によって変化するかどうかを確かめるために縮合反応時間の異なる(6時間と48時間)ゲルにCYTを封入し、それらの活性化エネルギーを比較した。

48時間縮合反応を行ったゲル中で観測されたフォールディング速度は、6時間縮合反応を行ったゲル中で観測されたものに比べて2倍程度遅くなった(図5-1(a))。これは、縮合反応時間によって、ゲルマトリックスの形成の度合いが変わるためであると考えられる。また、それぞれのゲルでの初期中間体のCDスペクトルはわずかに違いがみられたが、これはゲル中で不可逆に変性した分子種が存在することや、シリカゲルのマトリックス構造が強化されたことにより中間体が不安定化された可能性が考えられる。図5-1(a)にそれぞれのゲルでのアレニウス・プロットを示した。両方のゲルで速度定数の対数は、 T の逆数に対して直線的に変化し、正の活性化エネルギーが存在すること示唆した。また、それらの活性化エネルギーの値は互いに近かった(表5-1)。このことから、ゲル中で観測される活性化エネルギーはゲルの条件によって大きく変化しないことが示された。

つづいてそれぞれのタンパク質のリフォールディング反応を 5°C から 25°C の間で行った。シリカゲルの縮合反応は 25°C でELG、HTL、BLAで2時間、LYZで6時間行った。それぞれのタンパク質でのアレニウス・プロットを図5-1(b)に示した。CYTの場合と同様に、すべてのタンパク質においてフォールディング初期段階に活性化エネルギーがあることがわかった。それぞれのタンパク質で算出された活性化エネルギーの値を表5-1にまとめた。

5.3. 考察

上記の結果より、CYTの $U' \rightarrow I$ の反応に約 15 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(表5-1)。以前の秋山らによる連続フロー法を用いたCYTのリフォールディング実験では、本研究で観測された $U' \rightarrow I$ の反応に対応する初期反応が400マイクロ秒以内に起こることがCDスペクトルの変化からわかっている(90)。また、ShastryとRoderによる連続フロー法を用

いたリフォールディング実験では、この初期反応がおよそ $17,000\text{s}^{-1}$ 速度定数をもつ指数関数として蛍光検出によって観測されており、pH 4.5 で $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲でアレニウス・プロットを用いて算出した活性化エネルギーは約 30 kJ/mol であった(110)。また、連続フロー法よりも短い不感時間をもつレーザー温度ジャンプ法を用いたリフォールディング実験では、蛍光検出によってより速い時間域から初期反応を観測しており、 1.5 M の GdnHCl 存在下で $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ の範囲で算出された活性化エネルギーは 26 から 41 kJ/mol であった(111, 112)。本研究においてシリカゲル中で観測された活性化エネルギーが溶液中に比べわずかに小さかったのは、おそらくシリカゲルのマトリックスの影響によると考えられる。ただし、一つ留意すべき点は、上記の溶液中での CYT の活性化エネルギーは蛍光測定によるリフォールディング実験から算出されていることである。蛍光強度の変化は主に芳香族アミノ酸残基の周囲の環境変化を反映するため、仮に全体の二次構造量の変化を反映する CD で初期段階を測定した場合、速度定数やそれらの温度依存性(したがって、それらから算出される活性化エネルギー)が蛍光測定の場合と異なる可能性も十分に考えられる。事実、以前の柴山によって観測されたシリカゲル中における CYT の $U' \rightarrow I$ は、CD 測定の場合、式の β は 1 に近い値を示したが、蛍光と紫外光吸収で測定した場合、 β は 0.2 から 0.5 であった(61)。

中間体を蓄積しない二状態的なフォールディング反応を示すいくつかのタンパク質では、フォールディング反応の活性化エネルギーは $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近でおよそ 60 kJ/mol から 160 kJ/mol であり(113)、これらの値の差と比べると、CYT のシリカゲル中と溶液中で観測された活性化エネルギーの差は小さいことがわかる。

CYT 以外のタンパク質で算出された $U' \rightarrow I$ の活性化エネルギーは 17 kJ/mol から 31 kJ/mol であった(図 5-1(b)、表 5-1)。 α ヘリックスなどの二次構造は多くの水素結合の形成を伴うため、CD 測定によって算出されたこれらの値は、初期中間体の二次構造形成過程の活性化エネルギーを反映している可能性が高い。これを支持する例として、ペプチドを用いたヘリックス-コイル転移実験で 20 から 70 kJ/mol の活性化エネルギーが報告されている(114-116)。また、 17 残基のペプチドを用いたループ形成の実験からは 17 から 25 kJ/mol の活性化エネルギーが報告されている

(117)。しかし、一般的に球状タンパク質の熱容量は温度依存性をもつため、測定する温度範囲によって算出される活性化エネルギーも変化する(118)。したがって、本実験で用いたすべてのタンパク質で観測されたこれらの活性化エネルギーの値の比較やより深い議論をするためにはさらに広い温度範囲での実験が求められる(本研究で用いたシリカゲルでは高温条件下(> 35 °C)において再現性の高い結果を得ることができなかった)。

本研究で観測された活性化エネルギーに、ゲルマトリックスからの寄与が含まれていることは十分に考えられる。例えば、シリカゲルのマトリックスの表面はフリーのシラノール基によって負電荷に帯電しているため、タンパク質とシリカゲルの間の静電的な相互作用が存在している可能性が考えられる。しかし、過去の研究において、シリカゲル中に封入されたタンパク質が溶液中と同等の速度で回転運動をすることが観測されており(58, 119)、タンパク質-シリカゲル間の直接的な相互作用は非常に弱いと考えられる。タンパク質-シリカゲル間の間接的相互作用としては、溶媒の粘度が考えられる。Kramers の理論に基づくとタンパク質のダイナミクスは溶媒との摩擦によって影響を受けると考えられており(6, 120)、フォールディング反応などの溶液中の反応の速度定数は溶媒粘度に依存することが予測されている。室温付近で水の粘度はおよそ 17 kJ/mol の活性化エネルギーをもつことが知られており(121)、本研究において観測された活性化エネルギーに溶媒粘度による寄与が含まれている可能性も考えられる。現時点では、この可能性を完全に否定することはできないが、いずれにせよ、フォールディング初期段階は活性化エネルギー障壁を横断する反応であることが示唆される。また、3章で述べたモデルのように複数の経路で初期中間体の二次構造形成が起こるとすると、本研究において観測された活性化エネルギーは各経路の平均値であると考えられる。

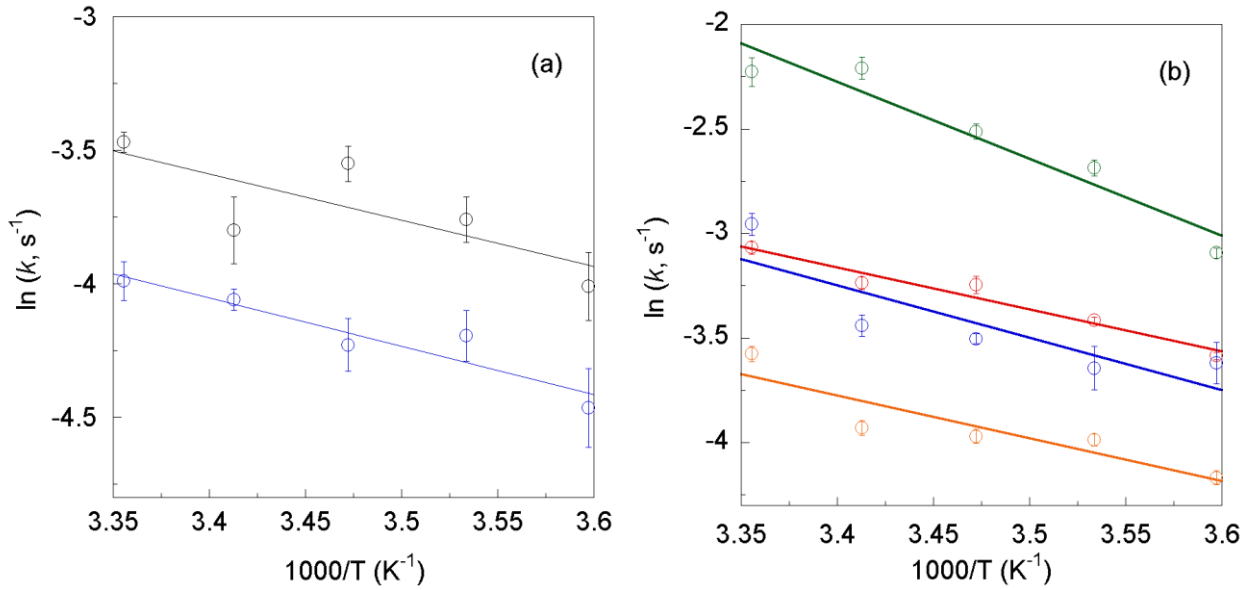


図 5-1. (a) CYT のリフォールディング初期反応の速度定数のアレニウス・プロット
 6 時間縮合反応を行ったゲル中(黒)と、48 時間縮合反応を行ったゲル中(青)で観測されたフォールディング初期反応の速度定数。
 (b) ELG(赤)、HTL(橙)、BLA(緑)、LYZ(青) のリフォールディング初期反応の速度定数のアレニウス・プロット
 算出された活性化エネルギーは表 5-1 に示した。

表 5-1. ゲル中で観測されたリフォールディング初期反応の活性化エネルギー

タンパク質	(U' → I)
	E_a (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

6章 総論

6.1. シリカゲル・マトリックスのフォールディング反応への影響

本研究においても、以前の柴山による研究と同様に、シリカゲルに封入されたタンパク質のフォールディング速度は溶液中に比べて非常に遅くなり、その結果、溶液中ではバースト相として観測されていた過程を時分割測定することに成功した。HTL では、CD スペクトルから初期中間体が酸変性状態と等価であることが示されたが、このような速度論的中間体は溶液中では捉えられていない(78)。今後、ゲル中で観測された初期中間体が溶液中で存在するかどうかについてストップフロー法よりも短い不感時間をもつ連続フローを用いたリフォールディング実験を行うことで明らかにする必要がある。

本研究でみられたようなシリカゲル中での反応速度の遅延効果が、どのようなメカニズムによってもたらされているのであろうか。シリカゲルがタンパク質分子に及ぼす影響として考えられる原因の一つに、タンパク質とシリカゲルマトリックス間の静電的な相互作用があげられる。5章でも述べたように、シリカゲルのマトリックスの表面は負電荷に帯電しているため、静電的な相互作用によってタンパク質分子がトラップされている可能性が考えられる。しかし、もしこのような静電的な相互作用が遅延効果の原因であるならば、塩基性タンパク質であるCYTとLYZのフォールディング速度だけが遅くなったはずである。また、過去の研究において、シリカゲル中に封入されたタンパク質が溶液中と同等の速度で回転運動をすることが観測されており(58, 119)、タンパク質－シリカゲル間の直接的な相互作用は非常に弱いと考えられる。よって、タンパク質－シリカゲル間の静電的な相互作用についても主な原因でないと考えられる。

一般的に、タンパク質のフォールディング速度は遷移状態理論に基づいて次式でうまく近似できる。

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}\right) \quad (\text{式 6-1})$$

ここで、前指数因子の k_0 は自由エネルギー障壁がないときの反応の最大速度を反映している(27)。

また ΔG^\ddagger は活性化自由エネルギーで、活性化エンタルピー ΔH^\ddagger と活性化エントロピーに ΔS^\ddagger 分けられる。

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (\text{式 6-2})$$

また、これを式 6-1 に使って、アレニウスの式(5-1)と比較することで、以下の活性化エネルギーと活性化エンタルピーの関係が導かれる。

$$E_a = \Delta H^\ddagger - RT \quad (\text{式 6-3})$$

5 章の結果からわかるように、本研究で観測された活性化エネルギーの値は、溶液中で観測されているタンパク質のフォールディング反応のもの比べて、ゲル中での大幅な反応速度の減少を説明できる程の大きな差はみられなかった。したがって、シリカゲル中での反応速度の大幅な減少はエントロピー項に起因する可能性が考えられる。

系全体のエントロピーはタンパク質分子と水分子の両方からの寄与を含む。タンパク質は広がった、秩序の乱れた状態すなわち変性状態においてエントロピー的に有利となる。しかし、水分子は、非極性の物体と接するとその境界において構造化(秩序化)し、エントロピー的に不利になる。よって、タンパク質は変性状態において露出している疎水性残基の面積を減らすようにコンパクトになる。このような水を介した効果は疎水的相互作用とよばれ、フォールディング反応の駆動力として特に重要な因子である。結局、フォールディング反応の進行にともなうタンパク質分子のエントロピーの減少は疎水的相互作用にともなう水のエントロピーの増加によって打ち消されると考えられている。

過去の研究でシリカゲル内からは、疎水的相互作用が溶液中に比べて弱くなっている可能性が指摘されている(63, 66, 67)。ゲル内ではマトリックス表面において水分子が構造化しているため、水分子のエントロピーが溶液中と比べて低いと考えられる。したがって、ゲル中では疎水的相互

作用が弱くなるため、結果的にフォールディング速度が減少するのかもしれない。しかし、疎水的相互作用が減少した場合、天然状態の安定性も減少すると考えられる。柴山による研究では、シリカゲル中では BLG のフォールディング速度は大幅に減少したにもかかわらず、GuHCl による変性実験の結果からゲル中での BLG の安定性は水溶液中の安定性と近い値であることが示されている(62)。したがって、少なくとも BLG のフォールディング速度の減少は、シリカゲル中での水分分子のエントロピーの変化では説明できない。一方、シリカゲル中への封入による空間の制限は、タンパク質のコンホメーションエントロピーを減少させると考えられる。このようなコンホメーションエントロピーの変化に伴う遷移状態の不安定化によって、自由エネルギー障壁が増大し、フォールディング速度が減速した可能性が考えられる。しかし、遷移状態に比べ変性状態が大きく不安定化した場合、自由エネルギー障壁は小さくなるため、観測した結果とは逆にフォールディング速度は増加するはずである。

式 6-1 においてエンタルピー項やエントロピー項以外で反応速度の大幅な減少を説明できるものに、前指数因子があげられる。Kramers の理論に基づくと、タンパク質フォールディングにおける前指数因子は、溶媒との摩擦などの外部摩擦と、ポリペプチド鎖内の内部摩擦の寄与を含んでおり、それらの大きさに反比例すると考えられる(120, 122)。したがって、シリカゲル中でのフォールディング速度の減少はこれらの外部および内部摩擦、またはそのどちらかが増大したことに起因している可能性が考えられる。シリカゲル中でのそのような摩擦の増大の原因は何であろうか。外部摩擦の増大の原因としては、タンパク質分子とシリカゲルのマトリックスとの非特異的な相互作用が考えられる。一方、内部摩擦に対しては、狭い空間内への閉じ込めによって、タンパク内部の摩擦の増大が考えられる。以前のスペクトリンドメインのフォールディング研究で、内部摩擦の増大によってフォールディング/アンフォールディング速度が減少することが報告されている(123, 124)。別の研究では、シャペニンである GroEL/ES の空洞内においてロダネーゼの C 末端ドメインのフォールディング速度が溶液中よりも遅くなることが報告されており、この現象は空洞内部の壁とタンパク質の摩擦やタンパク内部の摩擦の増大によることが示唆されている(125, 126)。今後、より詳細な情報を与えるシミュレーション研究によって、シリカゲル中におけるフォールディング速度減少の

原因説明に新たな知見がもたらされると期待される。

6.2. フォールディング初期段階におけるポリペプチド鎖の凝縮

これまでに多くのタンパク質でフォールディングの初期段階に大規模なポリペプチド鎖の凝縮が起こることが明らかになっている(21, 103, 105, 127, 128)。このような初期凝縮反応はコンホメーション空間を制限することでフォールディング反応を促進していると考えられている。また、しかし 1 章でも述べたように、これまでの方法では時間分解能や S/N 比の制約からこれらの凝縮反応が二次構造形成に先行して起きるのか、それとも同調して起きるのかについて見分けることは困難である。

本研究では、ELG、HTL、BLA、LYZ のフォールディング初期段階では、まず GdnHCl 濃度の減少に伴う CD 強度の変化が観測され、変性状態がコンパクトなアンサンブルへと変化する可能性が示された(3.3.2.参照)。GdnHCl 濃度の減少に伴う CD 強度の変化がシリカゲル中でも不感時間内に起きているという結果は、溶液中で変性状態アンサンブルが非常に素速く凝縮する事実と一致しているようにみえる。CYT では、混合実験(110, 128, 129)や温度ジャンプ実験(111)で、素速い凝縮がマイクロ秒域で起こることが明らかになっている。一方、柴山による研究(61)では、ユビキチンのゲル中での GdnHCl 濃度ジャンプによるフォールディング実験が行われているが、本研究で観測されたような不感時間内の CD 変化はみられていない。これは過去の研究(130)でユビキチンのフォールディング反応において二次構造形成に先行する凝縮反応が起きなかった結果と一致している。本研究では分子半径の変化を測定していないが、仮に $U \rightarrow U'$ における CD 強度の変化が変性剤濃度の減少によるポリペプチド鎖の凝縮を反映しているならば、本研究の結果は凝縮反応が二次構造形成に先行することを表していると考えられる。今後、蛍光プローブや X 線小角散乱法などを用いて直接、分子半径の変化を観測することができるようになれば、フォールディング初期段階における凝縮反応と二次構造形成の関係についてより詳細な知見が得られ、その結果として疎水性凝縮モデルとフレームワークモデル(1.2 参照)を見分けることが可能になると期待される。

6.3. フォールディング初期段階における活性化エネルギー

本研究の結果、シリカゲル中では従来 CD による測定ではバースト相中間体として観測される初期中間体が単一の指数関数で表される速度過程で形成されることが明らかとなった。また、アレニウス・プロットを用いた解析からそれらの反応には活性化エネルギー障壁が存在することが示された。これらの結果は、CD の初期値が変性状態からスタートしていたことと合わせると、初期中間体の変性状態と障壁によって隔てられており、これらの状態の転移は二状態的に起こることを示唆している。このようなフォールディング初期段階における活性化エネルギー障壁がどのようにしてもたらされているのだろうか。中間体を蓄積しない二状態的なフォールディング反応を示すいくつかのタンパク質のフォールディング反応の活性化エネルギーの値(25 °C 付近でおよそ 60 kJ/mol から 160 kJ/mol)を考慮すると、本実験で観測した 5 種類のタンパク質のフォールディング初期段階の活性化エネルギー (25 °C 付近でおよそ 15 から 31 kJ/mol)は近いことがわかる。このことはフォールディング初期段階における遷移には共通した相互作用が寄与していることを表しているのかもしれない。式 6-3 で示したように、活性化エネルギー E_a は活性化エンタルピーとして近似することができる。Chan らによる研究からは、多くのタンパク質のフォールディング反応でみられるエンタルピー的な障壁は、ポリペプチド鎖の疎水性領域が協同的に脱水和することに起因していることが示されている(113, 131, 132)。

6.4. まとめと展望

本研究ではシリカゲルを用いることで反応速度を減速させ、従来では実験上の制限から観測することが困難であった変性状態からバースト相中間体として観測されていた初期中間体の形成過程の時分割測定に成功した。また、これまでのフォールディング初期段階の研究ではプローブとして蛍光が用いられてきたが、今回 CD で観測できたことでフォールディング初期段階におけるタンパク質の二次構造の形成に関する情報を得ることができた。フォールディング初期段階の反応速度の温度依存からは、変性状態と初期中間体の間に活性化エネルギーの障壁が存在することが明らかとなった。今後、初期中間体の形成過程の速度の変性剤濃度依存についても測定していきたいと考えている。一般的に式 6-1 の ΔG^\ddagger は変性剤濃度に直線的に依存し、自由エネルギー

の障壁が存在する場合、速度定数 k は変性剤濃度に指数関数的に依存すると考えられている。一方、自由エネルギー障壁が十分に小さいか存在しない場合、 k は変性剤濃度に依存しないと考えられる(133)。一方で、シリカゲル中でも不感時間内に GdnHCl の濃度減少に伴う CD 強度の変化がみられ、それらの値は変性剤非存在下における変性状態の値に近かった。これらのことは、さらに早い段階では変性剤濃度の変化に伴うポリペプチド鎖の凝縮が起こることを表しているのかもしれない。今後、シリカゲルのマトリックス構造を強化するためにゲルの濃度を上げたり、ゲル作製時の縮合反応の時間を長くするなどして、今回不感時間内に起こった反応の時分割測定ができるかどうか確かめる必要がある。

今後、さまざまな検出法と組み合わせた実験を多くのタンパク質について行うことでタンパク質のフォールディング初期段階についてさらに多くの知見が得られると期待される。例えば、分子半径を直接測定することができる X 線散乱法を用いることで、素速い変性状態アンサンブルの凝縮過程を時分割測定できるようになると期待される。さらに、本研究のように CD を用いた結果と比較することで、フォールディング初期段階におけるタンパク質の凝縮と二次構造の形成に関する知見が得られると考えられる。しかし、シリカゲル中ではリフォールディング反応の速度が遅くなっているので、測定には長時間の露光が必要であり、放射線による試料へのダメージを検討しなければならないだろう。また、測定に用いるサンプルや、バックグラウンドに用いる同じ組成のシリカゲルに対して、高い均一性や再現性が求められると考えられる。一方、シリカゲル中では個々のタンパク質分子はゲルのマトリックスによって固定されているため、X 線散乱測定で用いるような高タンパク質濃度でも非特異的な凝集は防げるという利点もある。この点を活かせば、これまでに会合しやすく X 線散乱測定ができなかったサンプルの測定も可能になるだろう。また、NMR と組み合わせることで、フォールディング反応の初期段階について残基レベルの情報を得ることができると期待される。しかし、シリカゲル中ではタンパク質分子の運動が束縛されているために、各分子の等方性が溶液中にくらべて低くなっていることが考えられ、その結果、得られる共鳴線の広幅化が予想される。この問題は、サンプルのタンパク質濃度を高くすることで解決できるかもしれない。また、サンプルに均一な磁場をかけるために、均一なシリカゲルを作製することが重要になると考

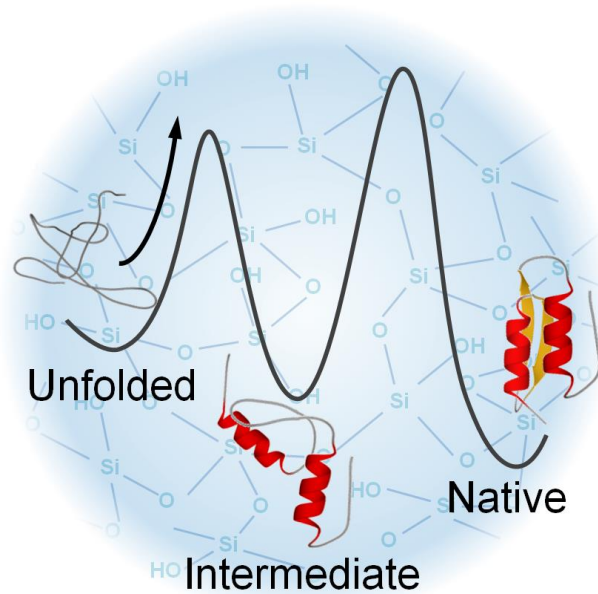
えられる。以前の研究では、シリカゲル中において天然状態のシトクロム b_5 とミオグロビンの 1 次元 $^1\text{H NMR}$ スペクトルの測定に成功している(134)。今後、シリカゲルや実験条件を検討することで高次元の NMR スペクトルの測定が可能なるかもしれない。また、シリカゲル中でのフォールディング実験に蛍光を用いた一分子測定が適応できれば、フォールディング初期段階における平均値化されていない特定の構造を観測することができると期待される。しかもこの場合、シリカゲルにタンパク質を固定できるという点で溶液よりも有利であると考えられる。

さらに、これらの方法をヘリックスを形成するようなペプチドのヘリックス-コイル転移の測定に用いることができれば、転移途上の分子の局所構造を観測することができるかもしれない。あるいは、協同性が失われているダウンヒル・フォールディング(135, 136)をシリカゲル中で観測することができれば、変性状態からの構造変化を連続的に観測することが可能になるかもしれない。また、本研究では、all- β と $\alpha + \beta$ 型のタンパク質について実験を行ったが、今後 all- α や α / β 型のタンパク質についての実験も重要であると考えられる。新井らによる以前の実験では、 β 構造の多いタンパク質では疎水性凝縮モデルに近いフォールディング反応であるのに対し、 α 構造の多いタンパク質では、それらよりもフレームワークモデルに近いことが示されている(22)。したがって、立体構造のクラスが異なるタンパク質において、これまでに時分割測定が困難であったフォールディング初期段階をシリカゲル中で包括的に研究することは、フォールディングのモデルの解明に重要である。

フォールディング反応以外でも、生体高分子の素早い構造変化を伴う反応にはシリカゲルを用いた今回の方法は有用であると考えられる。あるいは、溶液中では会合や凝集によって、単量体での構造変化を測定することが難しい分子でも、シリカゲル中であればそれぞれの分子がゲルのマトリックスに固定されることで観測が可能になると期待される。

もちろん、今回観測されたようなシリカゲル中での反応速度の減少がどのようなメカニズムによってもたらされているのかについても明らかにされなければならない。また、そのような効果がタンパク質のフォールディング反応や安定性にどのような影響を及ぼしているのかについても、さらに明らかにされれば、溶液中で得られている過去のデータとのより定量的な比較も可能になるだろう。

特に、多くの研究でシリカゲル中などにおける狭い空間内での水分子の挙動がバルクな状態とは異なることが示されている(68-72)ことから考えて、水分子の影響も含めた研究が必要であると考えられる。このような研究から、今後、タンパク質のフォールディング反応の全体像の解明に新しい展開がもたらされることが期待される。



参考文献

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181, 223-230.
2. Karplus, M. (1997) The Levinthal paradox: yesterday and today, *Fold Des* 2, S69-75.
3. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S., and Weikl, T. R. (2008) The protein folding problem, *Annu Rev Biophys* 37, 289-316.
4. Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding, *J Chim Phys* 65, 44-45.
5. Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins, *Annu Rev Biochem* 59, 631-660.
6. Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Succi, N. D., and Wolynes, P. G. (1995) Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis, *Proteins* 21, 167-195.
7. Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D., and Chan, H. S. (1995) Principles of protein folding--a perspective from simple exact models, *Protein Sci* 4, 561-602.
8. Dill, K. A., and MacCallum, J. L. (2012) The protein-folding problem, 50 years on, *Science* 338, 1042-1046.
9. Service, R. F. (2008) Problem solved* (*sort of), *Science* 321, 784-786.
10. Jackson, S. E. (1998) How do small single-domain proteins fold?, *Fold Des* 3, R81-91.
11. Fersht, A. R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 7, 3-9.
12. Bhattacharyya, S., and Varadarajan, R. (2013) Packing in molten globules and native states, *Curr Opin Struct Biol* 23, 11-21.
13. Roder, H., and Colon, W. (1997) Kinetic role of early intermediates in protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 7, 15-28.
14. Udgaonkar, J. B., and Baldwin, R. L. (1988) NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A, *Nature* 335, 694-699.
15. Sauder, J. M., and Roder, H. (1998) Amide protection in an early folding intermediate of cytochrome *c*, *Fold Des* 3, 293-301.
16. Tsytlonok, M., and Itzhaki, L. S. (2013) The how's and why's of protein folding intermediates, *Arch Biochem Biophys* 531, 14-23.
17. Hu, W., Walters, B. T., Kan, Z. Y., Mayne, L., Rosen, L. E., Marqusee, S., and Englander, S. W. (2013) Stepwise protein folding at near amino acid resolution by hydrogen exchange and mass spectrometry, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7684-7689.
18. Ptitsyn, O. B. (1995) Molten globule and protein folding, *Adv Protein Chem* 47, 83-229.
19. Arai, M., and Kuwajima, K. (2000) Role of the molten globule state in protein folding, *Adv Protein Chem* 53, 209-282.
20. Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure, *Proteins* 6, 87-103.

21. Udgaonkar, J. B. (2013) Polypeptide chain collapse and protein folding, *Arch Biochem Biophys* 531, 24-33.
22. Arai, M., Kondrashkina, E., Kayatekin, C., Matthews, C. R., Iwakura, M., and Bilsel, O. (2007) Microsecond hydrophobic collapse in the folding of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase, an alpha/beta-type protein, *J Mol Biol* 368, 219-229.
23. Dill, K. A. (1985) Theory for the folding and stability of globular proteins, *Biochemistry* 24, 1501-1509.
24. Robson, B., and Pain, R. H. (1971) Analysis of the code relating sequence to conformation in proteins: possible implications for the mechanism of formation of helical regions, *J Mol Biol* 58, 237-259.
25. Gutin, A. M., Abkevich, V. I., and Shakhnovich, E. I. (1995) Is burst hydrophobic collapse necessary for protein-folding, *Biochemistry* 34, 3066-3076.
26. Kim, P. S., and Baldwin, R. L. (1982) Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding, *Annu Rev Biochem* 51, 459-489.
27. Eaton, W. A., Munoz, V., Hagen, S. J., Jas, G. S., Lapidus, L. J., Henry, E. R., and Hofrichter, J. (2000) Fast kinetics and mechanisms in protein folding, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 327-359.
28. Ferguson, N., and Fersht, A. R. (2003) Early events in protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 13, 75-81.
29. Roder, H., Maki, K., Cheng, H., and Shastry, M. C. (2004) Rapid mixing methods for exploring the kinetics of protein folding, *Methods* 34, 15-27.
30. Kathuria, S. V., Guo, L., Graceffa, R., Barrea, R., Nobrega, R. P., Matthews, C. R., Irving, T. C., and Bilsel, O. (2011) Structural insights into early folding events using continuous-flow time-resolved small-angle X-ray scattering, *Biopolymers* 95, 550-558.
31. Nolting, B., Golbik, R., Neira, J. L., SolerGonzalez, A. S., Schreiber, G., and Fersht, A. R. (1997) The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 826-830.
32. Nolting, B., Golbik, R., and Fersht, A. R. (1995) Submillisecond events in protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10668-10672.
33. Hagen, S. J., Hofrichter, J., Szabo, A., and Eaton, W. A. (1996) Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11615-11617.
34. Jones, C. M., Henry, E. R., Hu, Y., Chan, C. K., Luck, S. D., Bhuyan, A., Roder, H., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1993) Fast events in protein folding initiated by nanosecond laser photolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11860-11864.
35. Callender, R., and Dyer, R. B. (2002) Probing protein dynamics using temperature jump relaxation spectroscopy, *Curr Opin Struct Biol* 12, 628-633.
36. Hofrichter, J. (2001) Laser temperature-jump methods for studying folding dynamics,

Methods Mol Biol 168, 159-191.

37. Phillips, C. M., Mizutani, Y., and Hochstrasser, R. M. (1995) Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7292-7296.
38. Eaton, W. A., Munoz, V., Thompson, P. A., Henry, E. R., and Hofrichter, J. (1998) Kinetics and dynamics of loops, alpha-helices, beta-hairpins, and fast-folding proteins, *Acc Chem Res* 31, 745-753.
39. Gruebele, M., Sabelko, J., Ballew, R., and Ervin, J. (1998) Laser temperature jump induced protein refolding, *Acc Chem Res* 31, 699-707.
40. Roder, H., Maki, K., and Cheng, H. (2006) Early events in protein folding explored by rapid mixing methods, *Chem Rev* 106, 1836-1861.
41. Kuwajima, K., Yamaya, H., Miwa, S., Sugai, S., and Nagamura, T. (1987) Rapid formation of secondary structure framework in protein folding studied by stopped-flow circular dichroism, *FEBS Lett* 221, 115-118.
42. Kathuria, S. V., Chan, A., Graceffa, R., Paul Nobrega, R., Robert Matthews, C., Irving, T. C., Perot, B., and Bilsel, O. (2013) Advances in turbulent mixing techniques to study microsecond protein folding reactions, *Biopolymers* 99, 888-896.
43. Kuwajima, K., Yamaya, H., and Sugai, S. (1996) The burst-phase intermediate in the refolding of beta-lactoglobulin studied by stopped-flow circular dichroism and absorption spectroscopy, *J Mol Biol* 264, 806-822.
44. Houry, W. A., Rothwarf, D. M., and Scheraga, H. A. (1996) Circular dichroism evidence for the presence of burst-phase intermediates on the conformational folding pathway of ribonuclease A, *Biochemistry* 35, 10125-10133.
45. Camilloni, C., Sutto, L., Provasi, D., Tiana, G., and Broglia, R. A. (2008) Early events in protein folding: Is there something more than hydrophobic burst?, *Protein Sci* 17, 1424-1433.
46. Gelman, H., and Gruebele, M. (2014) Fast protein folding kinetics, *Q Rev Biophys*, 1-48.
47. Gruebele, M. (1999) The fast protein folding problem, *Annu Rev Phys Chem* 50, 485-516.
48. Eaton, W. A. (1999) Searching for "downhill scenarios" in protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5897-5899.
49. Ellerby, L. M., Nishida, C. R., Nishida, F., Yamanaka, S. A., Dunn, B., Valentine, J. S., and Zink, J. I. (1992) Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method, *Science* 255, 1113-1115.
50. Sakai-Kato, K., and Ishikura, K. (2009) Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology, *Anal Sci* 25, 969-978.
51. Shibayama, N., and Saigo, S. (1999) Kinetics of the allosteric transition in hemoglobin within silicate sol-gels, *J Am Chem Soc* 121, 444-445.
52. Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Bruno, S., Bettati, S., Bonaccio, M., and Mozzarelli, A. (2001) Functional characterization of heme proteins encapsulated in wet nanoporous silica

- gels, *J Nanosci Nanotechnol* 1, 407-415.
53. Shibayama, N., and Saigo, S. (2001) Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin, *FEBS Lett* 492, 50-53.
 54. Wang, G. H., and Zhang, L. M. (2009) A biofriendly silica gel for in situ protein entrapment: biopolymer-assisted formation and its kinetic mechanism, *J Phys Chem B* 113, 2688-2694.
 55. Shibayama, N., and Saigo, S. (1995) Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels, *J Mol Biol* 251, 203-209.
 56. Bhatia, R. B., Brinker, C. J., Gupta, A. K., and Singh, A. K. (2000) Aqueous sol-gel process for protein encapsulation, *Chem Mater* 12, 2434-2441.
 57. Lan, E. H., Dunn, B., Valentine, J. S., and Zink, J. I. (1996) Encapsulation of the ferritin protein in sol-gel derived silica glasses, *J Sol-Gel Sci Technol* 7, 109-116.
 58. Pastor, I., Ferrer, M. L., Lillo, M. P., Gomez, J., and Mateo, C. R. (2007) Structure and dynamics of lysozyme encapsulated in a silica sol-gel matrix, *J Phys Chem B* 111, 11603-11610.
 59. Campanini, B., Bologna, S., Cannone, F., Chirico, G., Mozzarelli, A., and Bettati, S. (2005) Unfolding of green fluorescent protein mut2 in wet nanoporous silica gels, *Protein Sci* 14, 1125-1133.
 60. Bettati, S., and Mozzarelli, A. (1997) T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride, *J Biol Chem* 272, 32050-32055.
 61. Shibayama, N. (2008) Slow motion analysis of protein folding intermediates within wet silica gels, *Biochemistry* 47, 5784-5794.
 62. Shibayama, N. (2008) Circular dichroism study on the early folding events of beta-lactoglobulin entrapped in wet silica gels, *FEBS Lett* 582, 2668-2672.
 63. Peterson, E. S., Leonard, E. F., Foulke, J. A., Oliff, M. C., Salisbury, R. D., and Kim, D. Y. (2008) Folding myoglobin within a sol-gel glass: protein folding constrained to a small volume, *Biophys J* 95, 322-332.
 64. Samuni, U., Navati, M. S., Juszczak, L. J., Dantsker, D., Yang, M., and Friedman, J. M. (2000) Unfolding and refolding of sol-gel encapsulated carbonmonoxymyoglobin: An orchestrated spectroscopic study of intermediates and kinetics?, *J Phys Chem B* 104, 10802-10813.
 65. Sabelko, J., Ervin, J., and Gruebele, M. (1999) Observation of strange kinetics in protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6031-6036.
 66. Eggers, D. K., and Valentine, J. S. (2001) Crowding and hydration effects on protein conformation: a study with sol-gel encapsulated proteins, *J Mol Biol* 314, 911-922.
 67. Eggers, D. K., and Valentine, J. S. (2001) Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability, *Protein Sci* 10, 250-261.
 68. Rasaiah, J. C., Garde, S., and Hummer, G. (2008) Water in nonpolar confinement: from

- nanotubes to proteins and beyond, *Annu Rev Phys Chem* 59, 713-740.
69. Crupi, V., Majolino, D., Migliardo, P., and Venuti, V. (2002) Neutron scattering study and dynamic properties of hydrogen-bonded liquids in mesoscopic confinement. 1. The water case, *J Phys Chem B* 106, 10884-10894.
 70. Milischuk, A. A., and Ladanyi, B. M. (2011) Structure and dynamics of water confined in silica nanopores, *J Chem Phys* 135, 174709.
 71. Sorin, E. J., and Pande, V. S. (2006) Nanotube confinement denatures protein helices, *J Am Chem Soc* 128, 6316-6317.
 72. Lucent, D., Vishal, V., and Pande, V. S. (2007) Protein folding under confinement: a role for solvent, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10430-10434.
 73. 内山亮. (2009) 創価大学修士論文
 74. Breustedt, D. A., Chatwell, L., and Skerra, A. (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65, 1118-1125.
 75. Pike, A. C., Brew, K., and Acharya, K. R. (1996) Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase, *Structure* 4, 691-703.
 76. Ueno, T., Abe, S., Koshiyama, T., Ohki, T., Hikage, T., and Watanabe, Y. (2010) Elucidation of metal-ion accumulation induced by hydrogen bonds on protein surfaces by using porous lysozyme crystals containing Rh(III) ions as the model surfaces, *Chemistry* 16, 2730-2740.
 77. Fujiwara, K., Arai, M., Shimizu, A., Ikeguchi, M., Kuwajima, K., and Sugai, S. (1999) Folding-unfolding equilibrium and kinetics of equine beta-lactoglobulin: equivalence between the equilibrium molten globule state and a burst-phase folding intermediate, *Biochemistry* 38, 4455-4463.
 78. Tsukamoto, S., Yamashita, T., Yamada, Y., Fujiwara, K., Maki, K., Kuwajima, K., Matsumura, Y., Kihara, H., Tsuge, H., and Ikeguchi, M. (2009) 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, 226-236.
 79. Ikeguchi, M., Kuwajima, K., Mitani, M., and Sugai, S. (1986) 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, 6965-6972.
 80. Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M., and Sugai, S. (1985) Comparison of the transient folding intermediates in lysozyme and alpha-lactalbumin, *Biochemistry* 24, 874-881.
 81. Arai, M., Ito, K., Inobe, T., Nakao, M., Maki, K., Kamagata, K., Kihara, H., Amemiya, Y., and Kuwajima, K. (2002) Fast compaction of alpha-lactalbumin during folding studied by stopped-flow X-ray scattering, *J Mol Biol* 321, 121-132.
 82. Radford, S. E., Dobson, C. M., and Evans, P. A. (1992) The folding of hen lysozyme

- involves partially structured intermediates and multiple pathways, *Nature* 358, 302-307.
83. Chaffotte, A. F., Guillou, Y., and Goldberg, M. E. (1992) Kinetic resolution of peptide bond and side chain far-UV circular dichroism during the folding of hen egg white lysozyme, *Biochemistry* 31, 9694-9702.
 84. Matagne, A., and Dobson, C. M. (1998) The folding process of hen lysozyme: a perspective from the 'new view', *Cell Mol Life Sci* 54, 363-371.
 85. Chen, L., Wildegger, G., Kiefhaber, T., Hodgson, K. O., and Doniach, S. (1998) Kinetics of lysozyme refolding: structural characterization of a non-specifically collapsed state using time-resolved X-ray scattering, *J Mol Biol* 276, 225-237.
 86. Dobson, C. M., Evans, P. A., and Radford, S. E. (1994) Understanding how proteins fold - the lysozyme story so far, *Trends Biochem Sci* 19, 31-37.
 87. Wijesinha-Bettoni, R., Dobson, C. M., and Redfield, C. (2001) Comparison of the denaturant-induced unfolding of the bovine and human alpha-lactalbumin molten globules, *J Mol Biol* 312, 261-273.
 88. Gohda, S., Shimizu, A., Ikeguchi, M., and Sugai, S. (1995) The superreactive disulfide bonds in alpha-lactalbumin and lysozyme, *J Protein Chem* 14, 731-737.
 89. Greenfield, N., and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation, *Biochemistry* 8, 4108-4116.
 90. Akiyama, S., Takahashi, S., Ishimori, K., and Morishima, I. (2000) Stepwise formation of alpha-helices during cytochrome *c* folding, *Nat Struct Biol* 7, 514-520.
 91. Kane, A. S., Hoffmann, A., Baumgartel, P., Seckler, R., Reichardt, G., Horsley, D. A., Schuler, B., and Bakajin, O. (2008) Microfluidic mixers for the investigation of rapid protein folding kinetics using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy, *Anal Chem* 80, 9534-9541.
 92. Ikeguchi, M. (2014) Transient non-native helix formation during the folding of beta-lactoglobulin, *Biomolecules* 4, 202-216.
 93. Nakagawa, K., Tokushima, A., Fujiwara, K., and Ikeguchi, M. (2006) Proline scanning mutagenesis reveals non-native fold in the molten globule state of equine beta-lactoglobulin, *Biochemistry* 45, 15468-15473.
 94. Forge, V., Wijesinha, R. T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C. V., Redfield, C., and Dobson, C. M. (1999) Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine alpha-lactalbumin, *J Mol Biol* 288, 673-688.
 95. Ikeguchi, M., Kuwajima, K., and Sugai, S. (1986) Ca²⁺-induced alteration in the unfolding behavior of alpha-lactalbumin, *J Biochem* 99, 1191-1201.
 96. Chakrabartty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S., and Baldwin, R. L. (1993) Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities, *Biochemistry* 32, 5560-5565.
 97. Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R., and Fersht, A. R. (1993) Circular dichroism

- studies of barnase and its mutants: characterization of the contribution of aromatic side chains, *Biochemistry* 32, 10303-10313.
98. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2004) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra, *Methods Enzymol* 383, 318-351.
 99. Rodríguez-Romero, A., Arreguín, B., and Hernández-Arana, A. (1989) Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues, *Biochim Biophys Acta* 998, 21-24.
 100. Plaxco, K. W., Simons, K. T., and Baker, D. (1998) Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins, *J Mol Biol* 277, 985-994.
 101. Kimura, T., Uzawa, T., Ishimori, K., Morishima, I., Takahashi, S., Konno, T., Akiyama, S., and Fujisawa, T. (2005) Specific collapse followed by slow hydrogen-bond formation of beta-sheet in the folding of single-chain monellin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2748-2753.
 102. Deniz, A. A., Laurence, T. A., Beligere, G. S., Dahan, M., Martin, A. B., Chemla, D. S., Dawson, P. E., Schultz, P. G., and Weiss, S. (2000) Single-molecule protein folding: diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5179-5184.
 103. Ziv, G., Thirumalai, D., and Haran, G. (2009) Collapse transition in proteins, *Phys Chem Chem Phys* 11, 83-93.
 104. Haran, G. (2012) How, when and why proteins collapse: the relation to folding, *Curr Opin Struct Biol* 22, 14-20.
 105. Sherman, E., and Haran, G. (2006) Coil-globule transition in the denatured state of a small protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11539-11543.
 106. Hagen, S. J. (2003) Exponential decay kinetics in "downhill" protein folding, *Proteins* 50, 1-4.
 107. Schulman, B. A., and Kim, P. S. (1996) Proline scanning mutagenesis of a molten globule reveals non-cooperative formation of a protein's overall topology, *Nat Struct Biol* 3, 682-687.
 108. Shimizu, A., Ikeguchi, M., and Sugai, S. (1993) Unfolding of the molten globule state of alpha-lactalbumin studied by ¹H NMR, *Biochemistry* 32, 13198-13203.
 109. Saigo, S., and Shibayama, N. (2003) Highly nonexponential kinetics in the early-phase refolding of proteins at low temperatures, *Biochemistry* 42, 9669-9676.
 110. Shastry, M. C., and Roder, H. (1998) Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale, *Nat Struct Biol* 5, 385-392.
 111. Hagen, S. J., and Eaton, W. A. (2000) Two-state expansion and collapse of a polypeptide, *J Mol Biol* 301, 1019-1027.
 112. Qiu, L., Zachariah, C., and Hagen, S. J. (2003) Fast chain contraction during protein folding: "foldability" and collapse dynamics, *Phys Rev Lett* 90, 168103.

113. Liu, Z. R., and Chan, H. S. (2005) Desolvation is a likely origin of robust enthalpic barriers to protein folding, *J Mol Biol* 349, 872-889.
114. Thompson, P. A., Munoz, V., Jas, G. S., Henry, E. R., Eaton, W. A., and Hofrichter, J. (2000) The helix-coil kinetics of a heteropeptide, *J Phys Chem B* 104, 378-389.
115. Huang, C. Y., Klemke, J. W., Getahun, Z., DeGrado, W. F., and Gai, F. (2001) Temperature-dependent helix-coil transition of an alanine based peptide, *J Am Chem Soc* 123, 9235-9238.
116. Wang, T., Zhu, Y., Getahun, Z., Du, D., Huang, C. Y., Degrado, W. F., and Gai, F. (2004) Length dependent helix-coil transition kinetics of nine alanine-based peptides, *J Phys Chem B* 108.
117. Huang, F., Hudgins, R. R., and Nau, W. M. (2004) Primary and secondary structure dependence of peptide flexibility assessed by fluorescence-based measurement of end-to-end collision rates, *J Am Chem Soc* 126, 16665-16675.
118. Oliveberg, M., Tan, Y. J., and Fersht, A. R. (1995) Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8926-8929.
119. Dave, B. C., Soyeze, H., Miller, J. M., Dunn, B., Valentine, J. S., and Zink, J. I. (1995) Synthesis of protein-doped sol-gel SiO₂ thin-films - evidence for rotational mobility of encapsulated cytochrome *c*, *Chem Mater* 7, 1431-1434.
120. Ansari, A., Jones, C. M., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1992) The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes, *Science* 256, 1796-1798.
121. Hagen, S. J., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (1997) Rate of intrachain diffusion of unfolded cytochrome *c*, *J Phys Chem B* 101, 2352-2365.
122. Cellmer, T., Henry, E. R., Hofrichter, J., and Eaton, W. A. (2008) Measuring internal friction of an ultrafast-folding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18320-18325.
123. Wensley, B. G., Batey, S., Bone, F. A., Chan, Z. M., Tumelty, N. R., Steward, A., Kwa, L. G., Borgia, A., and Clarke, J. (2010) Experimental evidence for a frustrated energy landscape in a three-helix-bundle protein family, *Nature* 463, 685-688.
124. Kwa, L. G., Wensley, B. G., Alexander, C. G., Browning, S. J., Lichman, B. R., and Clarke, J. (2014) The folding of a family of three-helix bundle proteins: spectrin r15 has a robust folding nucleus, unlike its homologous neighbours, *J Mol Biol* 426, 1600-1610.
125. Schuler, B., and Hofmann, H. (2013) Single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics--expanding scope and timescales, *Curr Opin Struct Biol* 23, 36-47.
126. Hofmann, H., Hillger, F., Pfeil, S. H., Hoffmann, A., Streich, D., Haenni, D., Nettels, D., Lipman, E. A., and Schuler, B. (2010) Single-molecule spectroscopy of protein folding in a chaperonin cage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11793-11798.
127. Zhu, L., Kurt, N., Choi, J., Lapidus, L. J., and Cavagnero, S. (2013) Sub-millisecond chain collapse of the *Escherichia coli* globin ApoHmpH, *J Phys Chem B* 117, 7868-7877.

128. Kathuria, S. V., Kayatekin, C., Barrea, R., Kondrashkina, E., Graceffa, R., Guo, L., Nobrega, R. P., Chakravarthy, S., Matthews, C. R., Irving, T. C., and Bilsel, O. (2014) Microsecond barrier-limited chain collapse observed by time-resolved FRET and SAXS, *J Mol Biol* 426, 1980-1994.
129. Chan, C. K., Hu, Y., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Eaton, W. A., and Hofrichter, J. (1997) Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1779-1784.
130. Jacob, J., Krantz, B., Dothager, R. S., Thiyagarajan, P., and Sosnick, T. R. (2004) Early collapse is not an obligate step in protein folding, *J Mol Biol* 338, 369-382.
131. Kaya, H., Liu, Z., and Chan, H. S. (2005) Chevron behavior and isostable enthalpic barriers in protein folding: successes and limitations of simple Go-like modeling, *Biophys J* 89, 520-535.
132. Ferguson, A., Liu, Z., and Chan, H. S. (2009) Desolvation barrier effects are a likely contributor to the remarkable diversity in the folding rates of small proteins, *J Mol Biol* 389, 619-636.
133. Sinha, K. K., and Udgaonkar, J. B. (2008) Barrierless evolution of structure during the submillisecond refolding reaction of a small protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7998-8003.
134. Wheeler, K. E., Nocek, J. M., and Hoffman, B. M. (2006) NMR spectroscopy can characterize proteins encapsulated in a sol-gel matrix, *J Am Chem Soc* 128, 14782-14783.
135. Liu, J., Campos, L. A., Cerminara, M., Wang, X., Ramanathan, R., English, D. S., and Munoz, V. (2012) Exploring one-state downhill protein folding in single molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 179-184.
136. Garcia-Mira, M. M., Sadqi, M., Fischer, N., Sanchez-Ruiz, J. M., and Munoz, V. (2002) Experimental identification of downhill protein folding, *Science* 298, 2191-2195.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導してくださった池口雅道教授、藤原和夫准教授に心から感謝申し上げます。本論文を執筆するにあたり、多くの貴重な御助言を頂きました久保いづみ教授、東京大学大学院総合文化研究科・新井宗仁准教授、環境共生工学専攻・清水昭夫教授に心から感謝申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、多くの貴重な御指導を頂きました塚本精一博士、中川香奈子博士、大友秀明博士、大友未央博士に心から感謝申し上げます。

このシリカゲルによる実験法を与えてくださり、多くの貴重な御指導を頂きました自治医科大学の柴山修哉教授に心から感謝申し上げます。

研究室に日々御尽力してくださり、さまざまな面でお世話になりました、先輩方、同期の皆様、後輩の皆様にこの場を借りて心から感謝申し上げます。

創価大学での研究生活と私の成長を心から応援し、温かく見守って下さいました家族の皆様に心から感謝申し上げます。

かけがえのない同志を与えてくださり、日々激励しつづけて下さいました、創立者であり人生の師匠である池田大作先生、香峯子夫人に心から感謝申し上げます。