The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛋白質のフォールディング反応
Author(s)	後藤, 祐児
Citation	大阪大学低温センターだより. 1998, 104, p. 1-9
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/5068
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

研究ノート

タンパク質のフォールディング反応

蛋白質研究所　後　藤　祐　児（内線8614）
E−mail:ygoto@protein.osaka−a.ac.jp

1．はじめに

タンパク質のX線結晶構造を見ると「よくもポリペプチド鎖がもつれることもなく、見事な立体構造にフォールディングしているものだ」と感心する（図1）。タンパク質のフォールディング反応(Protein Folding) は折り紙(Paper Folding) に例えられる。共に、広がった自由度の高い状態から、コンパクトでユニークな立体構造が構築される。しかも、小さな球状タンパク質であれば、この過程は可逆である。フォールディング反応に必要な情報は、タンパク質のアミノ酸配列に全て含まれている。折り紙は“ひとので”によって折られるが、タンパク質折り紙は“ひとりで”に折られる。そのしくみはいまだ、なぞである。タンパク質の立体構造や機能を理解するためは、タンパク質折り紙のなぞを解くことが必要である。私たちは、牛乳に多く含まれるβラクトグロブリンを材料として、フォールディング反応のなぞ解きを試みている。

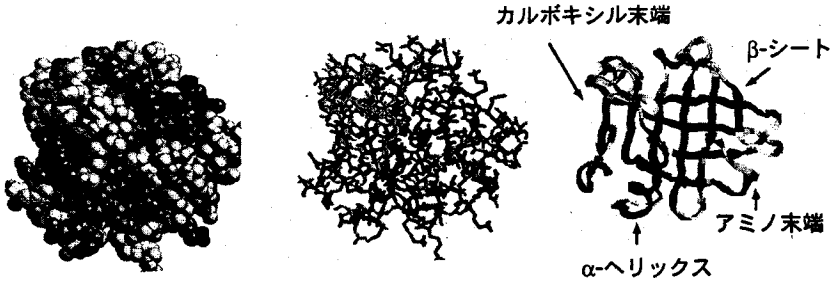

図1：βラクトグロブリンの立体構造の模式図。左上は空間充填モデル、右上は針金モデル、下はリボンモデルで表示したもの。ネイティブ構造では、ポリペプチド鎖が最密充填に匹敵するコンパクトさにフォールディングしている。リボンモデルではポリペプチド鎖がフォールディングするパターンをみることができる。フォールディングの代表的なパターンにはαヘリックス（ペプチド鎖がらせんに折れたたまれる）とβシート（ペプチド鎖が平行になるように折れたたまれる）があるが、βラクトグロブリンは主にβシートから構成される。

2．フォールディング反応とは？[1-3]

蛋白質のフォールディング反応とは、多数のアミノ酸が一次元的に連なったポリペプチド鎖が、機能的な立体構造（ネイティブ構造）を形成する過程である。遺伝子情報発現は次のように表わされる。

DNA配列（1次元）→RNA配列（1次元）→
アミノ酸配列（1次元）→タンパク質立体構造（3次元）

フォールディング以前の段階は、1対1の情報伝達であるのに対して、フォールディング反応では、ほとんど無限の可能性の中から特定の立体構造が選択される。そこで、フォールディング反応は、遺伝子情報発現の最終段階であると共に、遺伝子情報発現の中で最も複雑な過程であるといわれる。

タンパク質フォールディング反応の複雑さを指摘するものに、1960年代後半に提唱された“Levinthalのパラドックス”がある[4]。1972年にノーベル化学賞を授賞したAnfinsenの実験によると、フォールディングは熱力学的にコントロールされた反応である。すなわち、タンパク質のネイティブ構造はアミノ酸配列によって決まる自由エネルギーの最も低い状態である。ここで、100残基からなるタンパク質を考える。1残基あたりの自由度を少なく見積もって3とすると、タンパク質全体の可能なコンフォメーションの数は$3^{100} = 5 \times 10^{47}$以上となる。タンパク質が全てのコンフォメーションをランダムに検索してネイティブ構造にフォールディングすると仮定し、1つのコンフォメーションの検索時間を10^{-13}秒とする。このときフォールディングに要する時間は、5×10^{34}秒$=1.6 \times 10^{27}$年である。これではタンパク質は永久にフォールディングできない。そこで、フォールディングは速度論的にもコントロールされていると考えられる。別のいい方をすると、フォールディングには、無駄なコンフォメーションを回避しながらネイティブ構造に至るための“経路(Pathway)”があるに違いない。熱力学的コントロールは経路に依存しないのに対して、速度論的コントロールは経路依存を暗示する。「特定の経路を通って、かつ熱力学的に最も安定な状態に到達することは可能であろうか？」というのが、Levinthalの問題提起であった。

Levinthalはこの問題提起によって、フォールディング経路の存在することを示唆した。多くの研究者が影響を受け、フォールディングの中間状態を明らかにすることによって、フォールディングの経路を理解しようと試みてきた。あたかも折り紙の途中を知ることが、折り紙の折りかたを理解する近道であるかのように。

3．フォールディング研究の新たな展開

フォールディング反応を理解することは、タンパク質を理解する基盤となる重要な課題であることは間違いない。ただ、このような意義付けに基づく従来の研究は、物理化学的要素の強い基礎的研究とみられがちであった。ところが今日、フォールディング研究に対する認識に変革がもたらされている(1)。それは以下の発見や進展による。

（a）遺伝子操作や化学合成によってタンパク質を人為的に作製することが可能となった。しかし、タンパク質配列は完成しても、タンパク質立体構造の作製にてこずる場合がしばしばである。フォールディング反応を理解することは、現実的な重要課題となった。

（b）生体高分子の構造と機能に基づき、生命現象を理解しようとする構造生物学が台頭した。その中心にタンパク質がある。タンパク質の理解には、フォールディング反応の理解が必須である。フォールディング反応を研究することの基礎的重要性が再認識された。

（c）細胞内には分子シャペロンと呼ばれるフォールディング反応を助けるタンパク質の存在することが明らかとなった[5]。これに伴い細胞内でのフォールディング反応が実際の研究対象となり、より生物学的な分野まで研究が広がった。

（d）これらに加え、後で述べるように狂牛病におけるプリオン蛋白質の構造転移やアミロイド形成で注目されているように、病気とフォールディング反応の密接な関わりが明らかになってきた[6]。従来からの認識が高まると共に、生物学的な意義が加わったといってよい。

4．フォールディング反応のモデル

フォールディング反応のモデルをいくつか述べよう。最も代表的なものが、枠組みモデル(framework model）である。枠組みモデルでは、Levinthalのパラドックスに答えるように、ある経路を通って立体構造が段階的に形成される。「ツルには決まった折り方がある」といったモデルである。まず、2次構造（αヘリックス、βシート）の枠組みができて、次に3次構造（側鎖の特異的なパッキング）が完成する。フォールディング反応で最も難しいのは3次構造の形成と考え、その手前にある中間体はモルテン・グロビュール状態*と呼ばれる。このようなフォールディングをするタンパク質としてアポミオグロビンがあげられる（図2）。

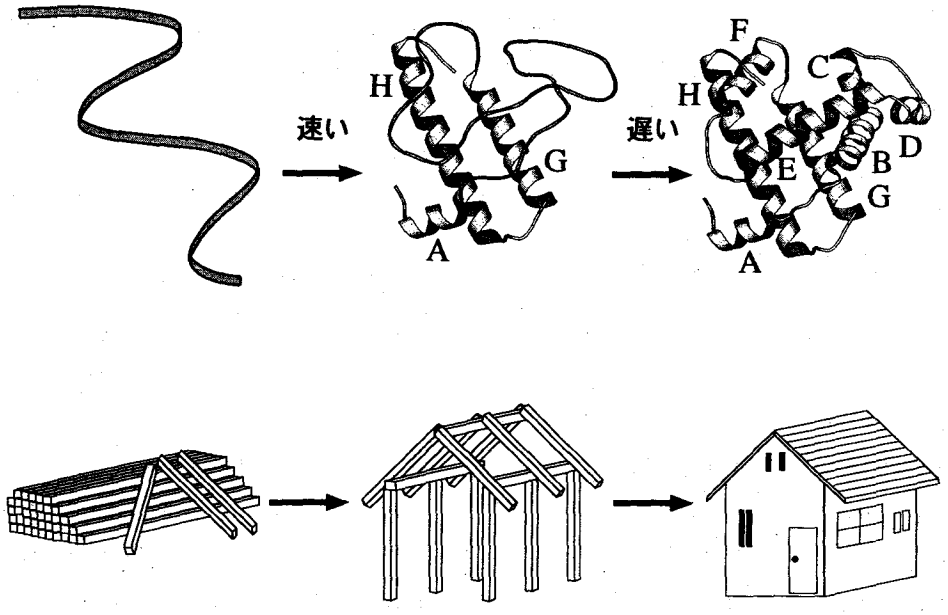

図2：アポミオグロビンのフォールディング。ミオグロビンは153アミノ酸残基から構成され、筋肉などの組織で酸素を運ぶタンパク質である。ミオグロビンはAからHの8本のαヘリックスから構成される。ミオグロビンからヘムを除くと、ヘリックスのほとんどはネイティブと同じだが、安定性の減少したアポミオグロビンになる。アポミオグロビンは、フォールディング反応が詳細に研究された代表的なタンパク質であり、ネイティブ構造が段階的にできあがることがわかっている。図に示した中間状態はA、G、Hのヘリックスをもつ。アミノ酸側鎖のパッキングなど周辺

他方、小さなタンパク質のフォールディング研究から支持されているのが、「フォールディングはさまざまな経路で起きる」というモデルである。ジグソーパズルを思い浮かべるとわかりやすい。ジグソー

パズルを解くのに、特定の経路をとる必要はない。もしあるとすれは、「ある中心的なかたちが作りやすい」という程度の選択性で、必ずしもそうである必要はない。

近年、いくつかの小さなタンパク質のフォールディング反応は、中間状態を形成することなく、ミリ秒の時間で極めて迅速に進行することがわかってきた。これらの結果はLevinthalのパラドックスとは反対に、タンパク質のフォールディング反応は本来、相当に速い反応であり、また多数の経路を含むことを示唆している。ジグソーパズルモデルはフォールディングファネル(folding funnel) という、より一般的な概念に発展している[4]。そして「中間状態はフォールディング反応を加速するために存在するのではなく、むしろフォールディングが何らかの理由により迅速に起きない場合にみえるのではないか」と考える研究者が増えている。

5．βラクトグロブリン

βラクトグロブリンは162残基から構成され、主にβシート構造をとるタンパク質である（図1）。βラクトグロブリンは牛乳の主要成分であり、1リットルの牛乳に数グラムも含まれる。栄養素としては重要である。ところが意外なことにヒト乳には全く含まれず、新生児の牛乳アレルギーの原因となる。“βラクトグロブリン除去”をアピールした新生児用粉ミルクも売られている。

私たちは、βラクトグロブリンに、トリフルオロエタノールなどのアルコールを加えると、極めて容易にαヘリックス構造に変わることを見い出した[7]。これより、βラクトグロブリンは大部分βシートからなるタンパク質であるであるにも関わらず、極めて高いαヘリックス形成傾向を隠しもっていることがわかった。これを裏付ける証拠として、従来の二次構造予測プログラムを用いると、ほとんどの領域がαヘリックスと“間違った予測”をされてしまう。これらは他のタンパク質では見られないβラクトグロブリンに特徴的な現象である。

タンパク質のネイティブ構造を安定化する力は、一次配列上近くのアミノ酸間の相互作用（局所的相互作用）と離れたアミノ酸間の相互作用（非局所的相互作用）に分けることができる。ネイティブ構造はこれらの総和によって決まる全体的な自由エネルギー最小状態である。非局所的相互作用は個々のタンパク質で大きく異なることから、二次構造予測に取り入れることは難しい。二次構造予測プログラムの成績が上がらない原因はここにある。アルコールは疎水的溶媒であり、タンパク質の疎水的相互作用（非局所的相互作用に含まれる）を弱める。アルコール添加や二次構造予測により“βラクトグロブリンびっくり箱”の鍵を開けると（非局所的相互作用を弱めると）、βシートの奥に隠されていたαヘリックスが飛び出してきたのである。βラクトグロブリンは、熱力学的に最も安定な構造（βシート）が、局所的相互作用がもたらす安定構造（αヘリックス）と大きくかけ離れているユニークな例である（図3）。

では、βラクトグロブリンのフォールディング反応はどのように進行するのであろうか？フォールディング反応の速度論的研究が行われた[8]。その結果、極めて速い時間（ミリ秒以内）にαヘリックスを含む中間状態の形成されることが明らかとなった（図3）。この中間体のαヘリックス含量はネイティブ構造より多かった。すなわち、フォールディング反応の初期に、過剰のαヘリックスが形成され、その後約数分で最終的なβシート構造に転換していった。この結果は、βラクトグロブリンの高いαヘリッ

クス形成傾向とよくあっている。しかし、ネイティブ構造が形成される以前に、ネイティブ構造にはないαヘリックスが形成されることは、枠組みモデルやジグソーパズルモデルとは対照的である。

βシート形成においてαヘリックス中間体の果たす役割は、何であろうか。もし、中間状態のαヘリックスが一旦ほどけて再びランダムコイルになり、次にβシートが形成されるとしたら、大変都合が悪い。このようなみかけの中間状態は“折れたたみ経路から外れた中間状態”と呼ばれる。他方、αヘリックス中間状態の形成により、タンパク質分子がコンパクトになり、その結果複雑なβシート構造の形成が促進されることも考えられる。αヘリックス中間状態は折れたたみ反応全体の進行を加速していないにしても、βラクトグロブリンのフォールディング反応には不可欠なものであると考えている。

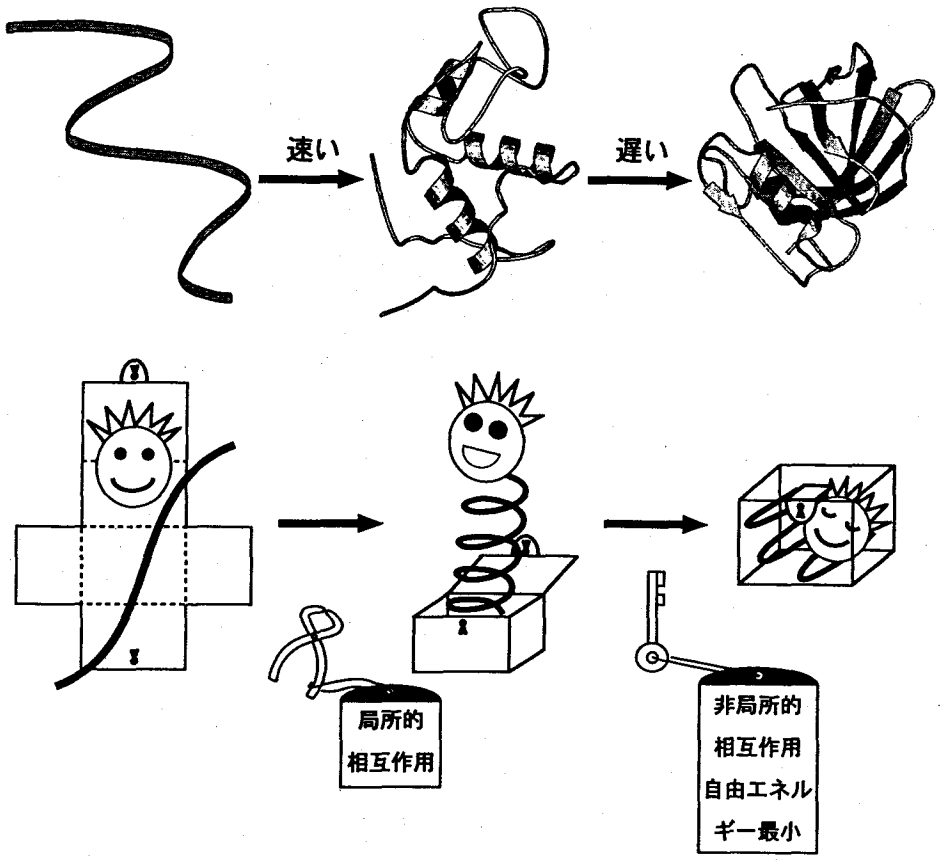

図3：βラクトグロブリンのフォールディング反応。αヘリックスを含む中間状態を経て、βシート構造が完成する。近くの残基間の相互作用（局所的相互作用）でびっくり箱の材料をつくる。遠くの残基間の相互作用（非局所的相互作用）によってびっくり箱のふたをしめると、αヘリックスはβシートになって箱の中に収まる。最近の研究から、αヘリックス中間体は、βシートの一部を含むことも示唆されている。

折り紙のツルを思い浮かべてみよう。ツルの羽や頭、尾は、決して段階的にはできない。紙を折たたみコンパクトにし、折り返しを何回かやるうちに、大きな構造変化が起きて、ツルが完成する。でき上がりと途中の構造が大きく異なる点、コンパクトにすることが重要な点など、βラクトグロブリンのフォールディングは、実に折り紙によく似ている。

現在、異種核NMRを用いて、中間状態の立体構造を残基レベルで解析している。^{15}N、^{13}C安定同位体で標識したウシ・βラクトグロブリンを、酵母を利用して発現させる[9]。これをNMRで解析することによって、タンパク質の立体構造をアミノ酸残基レベルで研究することが可能となる（図4）。今後、中間体のどの部分にαヘリックスやβシートがどの程度形成されているかを明らかにすることができると期待している。

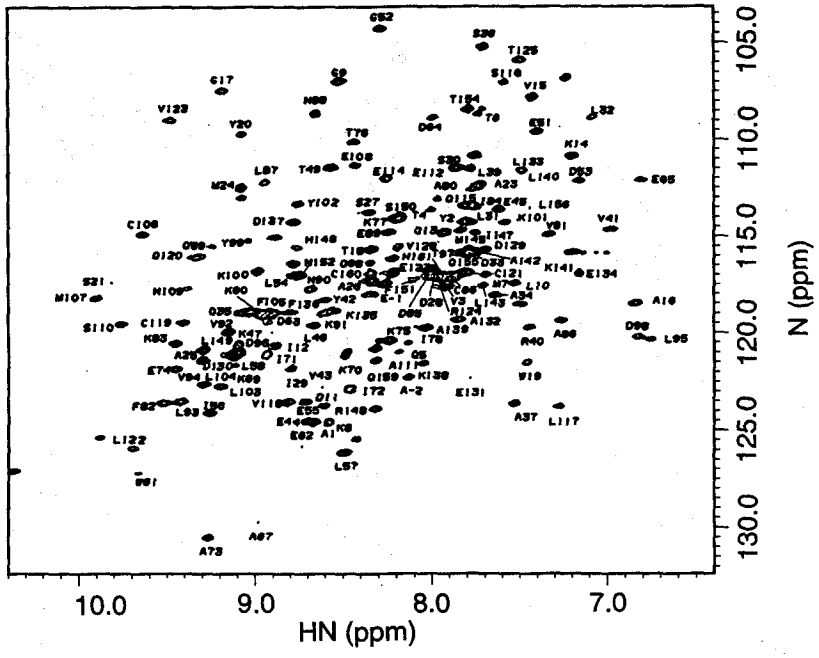

図4：βラクトグロブリンのネイティブ状態の^{1}H, ^{15}N HSQCNMRスペクトル。各ピークは、表示したアミノ酸残基のアミドの^{1}H, ^{15}N交差ピークを示す。これらを用いて、溶液中の二次構造やその変化を解析することができる。

6．α→β構造転移の一般性

βラクトグロブリンで観測された、“αヘリックスの過渡的形成と、より安定なβシートへの転移（α→β構造転移）”は、他のいくつかのタンパク質でも見られる。プラズミノーゲン活性化因子インヒビター1（ＰＡＩ－１）の例を紹介しよう[10]。ＰＡＩ－１は391アミノ酸残基より構成され、プラズミノーゲン活性化因子と１対１で結合してその活性を阻害する。活性型のＰＡＩ－１は不安定で、時間がたつと、より安定な不活性型に変化する。ＰＡＩ－１の活性部位はαヘリックスであるが、不活性化に伴い、αヘリックスはβシート構造の中に挿入され、新たな逆平行βストランドをつくる。この構造

転移はペプチド結合の切断を伴わないので、各種の変性剤、熱により不活性型のＰＡＩ－１から活性型を再生することができる。ＰＡＩ－１の活性型は速度論的にトラップされたフォールディングの中間状態に相当している。

さらに狂牛病やクロイツフェルト・ヤコブ病などの原因とされるプリオン蛋白質でも、$\alpha \rightarrow \beta$構造転移が、その伝播や発病に関与していることが示唆されている(6)。正常なプリオン蛋白質はだれもがもっており、αヘリックス構造をとっている。ところが何らかの原因でプリオンタンパク質に$\alpha \rightarrow \beta$構造転移が起きると、アミロイドと呼ばれる規則正しい繊維状の会合体を形成してしまい、発病に至る。プリオン蛋白質の$\alpha \rightarrow \beta$構造転移は、極めて低い確率で突発的に起きるが、特定のアミノ酸変異によりその確率が高まる。また、既に$\alpha \rightarrow \beta$構造転移を起こしたプリオンタンパク質によって、正常なプリオンタンパク質の$\alpha \rightarrow \beta$構造転移が誘起される。これらのプリオンタンパク質の$\alpha \rightarrow \beta$構造転移の機構やその意義については、まだ不明な点が多い。しかし、局所的相互作用によるαヘリックス構造のすばやい形成と、より安定なβ構造へのゆっくりとした変換という構図は、いくつかの蛋白質に共通しており、タンパク質のフォールディング機構の基本原理のひとつであることは間違いないと思う。

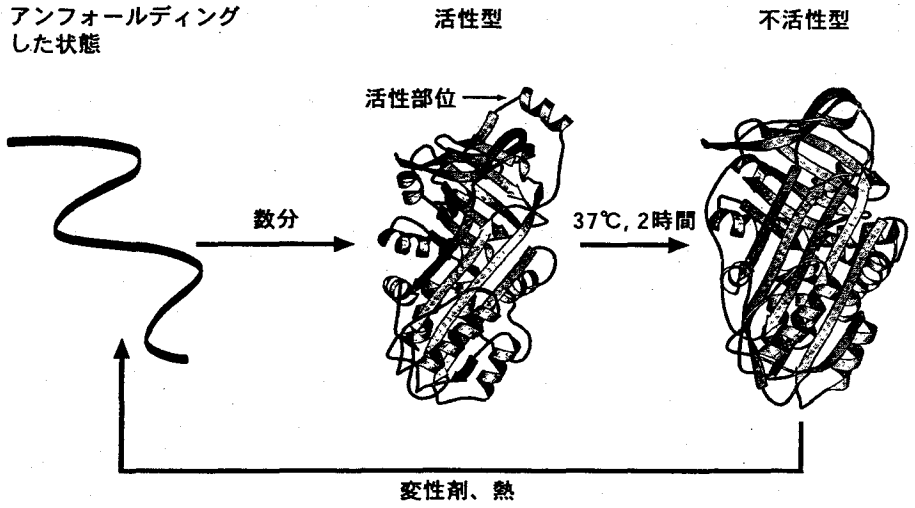

図５：プラズミノーゲン活性化因子インヒビターのフォールディング反応。活性型インヒビターの活性部位はαヘリックスである。より安定な不活性型では、このαヘリックスはβストランドになる。変性剤や熱により不活性型を壊してさせて、再び、活性型をつくることができる。$\alpha \rightarrow \beta$構造転移反応がタンパク質の機能を制御する例である。

7. おわりに

Anfinsenのフォールディング反応に対する熱力学的仮説は、あるアミノ酸配列に対応する立体構造はひとつであることを主張するものであった。しかし最近では、あるアミノ酸配列に対して異なった立体構造をとるタンパク質がいくつか明らかとなってきており、alternate fold（別の折り方）と呼ばれる。ここに紹介したＰＡＩ－１やプリオンタンパク質などの構造変化も、alternate fold に含まれる。

“だましぶね”という、帆と船首を交換する折り紙あそびがあるが、それを思い出す。Levinthalのパラドックスは、ネイティブなタンパク質に到達する経路がひとつであることを主張するものであったが、ジグソーパズルモデルで述べたように、さまざまな経路の存在や間違ってフォールディングした状態の重要性が議論されている。フォールディング研究の進展には目を見張るものがあるが、それが解明され、任意のアミノ酸配列に対して立体構造を予測することができるようになるには、まだまだ時間がかかりそうである。折り紙を思い浮かべながら、タンパク質のフォールディング反応のしくみや中間状態の役割を探ることの楽しみは当分続くであろう。

謝辞

共同研究者である桑田一夫（岐阜大学医学部）、星野大、Vincent Forge（たんぱく質研究所）、Carl Batt（コーネル大学）の諸氏に感謝する。

文献

1）Pain, R.H. Editor (1994) Mechanism of protein folding, Oxford Univ. Press. 日本語訳：崎山文夫,後藤祐児,河田康志訳(1995)タンパク質のフォールディング,シュプリンガーフェアラーク東京.

2）後藤祐児(1994)立体構造はどのようにしてできるか？,“蛋白質ーこの絶妙なる設計物（赤坂一之編）”pp.54－78吉岡書店.

3）星野大,後藤祐児(1997)フォールディング中間体,“タンパク質のかたちと物性（中村春木,有坂文雄編”pp.98－109,共立出版

4）Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels: The new view of protein folding kinetics. Nature Struct. Biol. 4, 10－19.

5）後藤祐児(1997)シャペロニンGroELによるタンパク質のフォールディング. 細胞工学,16,1250－1257.

6）Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. Science, 278, 245－251.

7）Shiraki, K., Nishikawa, K. & Goto, Y. (1995) Trifluoroethanol－induced stabilization of the α－helical structure of β－lactoglobulin: Implication for non－hierarchical protei n folding. J. Mol. Biol. 245, 180－194.

8）Hamada, D., Segawa, S. & Goto, Y. (1996) Non－native α－helical intermediate in the refolding of β－lactoglobulin, a predominantly β－sheet protein. Nature Struct. Biol. 3, 868－873.

9）Kim, T. R., Goto, Y., Hirota, N., Kuwata, K. & Batt, C. A. (1997) High level expression of bovine β－lactoglobulin in Pichia pastoris and characterization of its physi cal properties. Protein Eng. 10, 1339－1345.

10）Mottonen, J., Strand, A., Symersky, J., Sweet, R. M., Danley, D., Geoghegan, K. F., Gerard, R. D. & Goldsmith, E. J. (1992) Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor－1. Nature, 355, 270－273

用語説明

モルテン・グロビュール状態

ネイティブ状態と同様な多くの二次構造を含み、側鎖はフレキシブルなコンパクトな変性状態。タンパク質のフォールディング反応の主要で普遍的な中間状態として提唱された。しかし、さまざまなタンパク質で研究が行われた結果、実体は最初の定義とは異なることが明らかとなり、解釈について意見がわかれている。

フォールディング・ファネル

ファネル (funnel) とはロートを意味する。フォールディング反応のエネルギー曲面はロートを立てたようになっているという概念。ロートの縦軸はエネルギーを示し、横軸の広がりはコンフォメーションを示す。ロートの注ぎ口が変性状態であり、出口がネイティブ状態に相当する。小さなタンパク質のフォールディング反応は、エネルギーの高い変性状態から、エネルギーの低いネイティブ状態へと、ロートを水が流れ落ちるように進む。これが妨げられると、中間状態が蓄積したり、特定の経路が形成されると考える。

保 安 組 織 表

低温センターでは寒剤液化・供給業務を行なっていくにあたっては、高圧ガス保安法により、以下の保安管理のための組織を設けることが義務づけられています。

	吹田分室	豊中分室
保安総括者	城野政弘（工学部長）	櫛田孝司（理学部長）
〃 代理	濱口智尋（副センター長）	都福仁（センター長）
保安技術管理者	百瀬英毅	徂徠道夫
〃 代理	岡田東一	松尾隆祐
保安係員	牧山博美	鷹岡貞夫
〃 代理		石塚守

（平成10年10月現在）