

1C16

タンパク質反応解明を目指した生体分子科学研究

(京大院理) 寺嶋正秀

【はじめに】 タンパク質が機能する際には、その構造やエネルギーなどの状態に変化が起こる。もちろん、こうした変化の分子論的機構解明は、“通常の”分子科学研究の範疇にある。例えば、エンタルピーやエントロピーなどの熱力学的測定とその理論的考察から状態が特徴付けられているし、現在では数多くの分光学的測定法が進歩し、フェムト秒の時間スケールから化学結合の解裂や生成過程、電子移動、異性化反応などの機構が明らかにされるようになってきている。しかし、小さい分子の研究と、タンパク質研究を大きく異ならせているのは、(機能と言う問題は別にして)タンパク質の持つ天文学的な数の自由度とその複雑さにある。例えば、エタノールとエタノールの水素結合が切れるのを調べるには、水素結合に対応する振動の赤外吸収スペクトルとその時間変化を観れば、本質の大体の所は予想できるように、一部を見てもそれで全体像の本質が分かることもあるであろう。これに対して、タンパク質では分子内にも分子間にも多くの水素結合を持ち、構造が大きく変わるとともに、水素結合の組み換えが劇的に起こる。どのようにして分子間水素結合と分子内水素結合を区別して、時間変化を観ることができただろうか。こうした全体的な変化を、一本の水素結合変化として見分けるのは難しいし、またそれができたとしてもそれが反応を特徴付ける本質とは限らないのである。こうした時、いくつかの分子や原子団の動きだけを見ることをやめ、一步引いて大局を見ることで、これまで見えなかった全体像がつかめることもある。巨大な象のあまりにそばに寄りすぎて鼻の毛や足のつめをいくら調べても象の全体像や歩くダイナミクスが想像もできないのと同じである。ここでは、タンパク質の化学反応ダイナミクスを研究するいくつかの手法、特に系全体のダイナミクスを見るという最近進展した新しい手法と成果について概説する。

【方法】 こうした「隠された」ダイナミクスを「大局的な」観点から明らかにするために、我々はいくつかの新しい測定法を提出してきた。それは大きく分けて、時間分解熱力学法と、時間分解拡散係数測定法と呼べる。熱力学は、200年以上の歴史を通して、物質の状態を特徴付けたり反応進行の原因を明らかにするために大きな役割を果たしており、化学の中心的分野の一つである。一方、分光法による研究は様々なダイナミクスを明らかにしてきた。このように反応のダイナミクス解明と熱力学量の測定は、化学における両輪の役目を果たしており、ダイナミクスと熱力学から得られる情報を統合することによって、化学反応の理解はより深まるであろうが、これまでこれらの2つの分野の融合はほとんどなかった。それは、ごく最近までこうした熱力学量の速い時間分解測定が不可能であったためである。すなわち、熱力学量は定常状態で測られる量であり、その非平衡状態での時間発展や短寿命中間体に対して適用する手法がなく、そのため熱力学量から見たダイナミクスという概念がなかったのである。また、多くの化学反応は不可逆であり、平衡定数が求められない場合も多く、熱力学量が得られなかったという原理的な制限もある。

最近、この熱力学量の時間発展が時間分解法で調べることができるようになり、タンパク質反応の解明に大きな手がかりを与えることが分かってきた。例えば、体積変化を時間分解検出する事で、発色団から離れた部分の構造変化の存在とその速度を明らかにできる。従来は、吸収スペ

クトル変化がなければ反応がないと多くの場合認識されていたが、スペクトル変化にかからない中間体が種々存在する事が明らかとなっている。その一つの例が、フォトロピン2の光反応である。フォトロピンは、植物の持つ青色光感受性タンパク質であり、その反応が過渡吸収などで調べられてきた。最初のトリガーである発色団の反応ダイナミクスは吸収変化を伴うので詳細に調べられているが、それ以降の時間では吸収変化がないために、別の反応があるのかどうかさえ良く分かっていなかった。我々が時間分解熱力学量測定で得た、LOV2ドメインの中間体・その構造変化とエネルギースキームを図に示した。最終と思われていた S_{390} 体の後にも、このような多くの中間体が存在する事が明らかとなった。

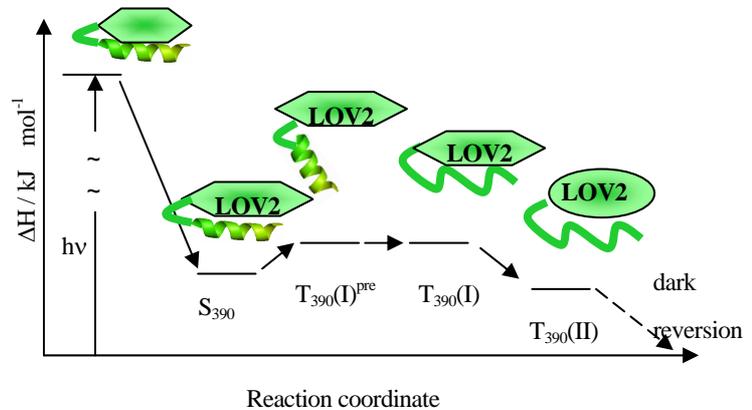


図 フォトリロピン2LOV2で同定された反応ダイナミクス

次の問題として、どうすれば分

子間と分子内水素結合の変化を区別して検出することができるであろうか。その一つの提案が、分子拡散を時間分解観測するという事である。分子運動としての動きやすさは拡散係数という一つの数値で表されるが、これは分子の大きさや粘度といった情報以外に、分子間相互作用についての情報を含み、特にタンパク質反応を調べる上で非常に有用であることが分かってきた。この値を測定するには、分子の空間上での動きを測定しなければならないが、拡散の動きは遅く、測定できるだけの距離を動かすためにはかなり時間がかかる。例えば、室温水溶液中で比較的小さい蛋白質が平均1mm動くためには、1時間以上かかるのである。よって、従来の方法では、測定に数10分から数時間のオーダーで時間がかかるため、反応に伴う変化という概念はなかった。これに対して、TG法を用いることで、マイクロ秒からミリ秒の時間スケールで拡散を観測することができる。この手法により、拡散係数が圧倒的に速く測定できるというメリット以上に、時間分解で刻々と変わる拡散係数が始めて測定可能となった。つまり、分子間相互作用の時間分解検出法として使われるようになったのである。この手法によって、従来は隠されていたドラスティックなタンパク質の構造変化が明らかにされ始めている。しかし、こうした研究はまだ我々のところで始まったばかりであり、多くの研究者はその有効性を認識していない事が多い。ここでは、実例に基づいて、この手法の強力さを示したい。

【謝辞】 これらの研究は、研究室の多くの学生とスタッフ、そして多くの共同研究者との成果である。ここに深く感謝いたします。

【文献】 M. Terazima, Bull.Chem.Soc.Jpn, 77,23-41, (2004).: Y. Nishioku et al. *Biophys.J.*, 83,1136-1146(2002).: K.Takeshita, et al., *Biophys.J.*, 83, 1567-1577(2002).: T.Nada, M.Terazima, *Biophys.J.*, 85,1876-1881(2003).: S.Nishida et al., *Biophys.J.*, 87, 2663-2675(2004). : Y.Nishihara et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 126, 11877-11888(2004).: K.Inoue, et al., *Biophys.J.*, 87, 2587-2597(2004). T.Eitoku et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 127,13238-13244(2005).: T.Eitoku et al., *Biophys.J.*, 91,3797-3804(2006).: Y.Nakasone et al., *Biophys.J.*, 91, 645-653(2006).: T. Eitoku et al., *J.Mol.Biol.*, in press. Y.Nakasone et al., *J.Am.Chem.Soc.*, 129, 7028-7035(2007).: K.Inoue, et al., *Biophys.J.*, 92, 3643-3651(2007).: