

## ヘテロダイン電子和周波発生(HD-ESFG)分光法の 生体分子高次構造決定への適用

(東邦大・理<sup>1</sup>, 理研・田原分子分光<sup>2</sup>)

細井 晴子<sup>1</sup>・山口 祥一<sup>2</sup>・二本柳 聡史<sup>2</sup>・田原 太平<sup>2</sup>

タンパク質の立体構造を知ることは、生体内におけるタンパク質の機能発現や制御機構を解明する上で非常に重要である。構造解析法として一般的な X 線結晶構造解析法や核磁気共鳴法によって、タンパク質のほぼ全原子の三次元座標という、いわば“完全な”構造情報が得られる。しかし、タンパク質の構造 - 機能相関を調べるとき、常に完全な構造情報が必要なわけではない。リボンモデルやシリンダーモデルのような“完全ではないが見やすい”立体構造表示がしばしば用いられるように、完全ではない構造情報でも、タンパク質の研究に十分に役立つことが多い。

結晶化しにくい膜タンパク質や分子量が巨大となるタンパク質複合体では、完全な構造情報を得ることは通常難しい。そのような場合、完全ではないが役に立つ構造情報を得るために、色々な実験が行われている。例えば膜タンパク質の場合、図 1a に模式的に示す膜配向性を決定する上で、レポータータンパク質や色素を用いた生化学的解析が行われている。また図 1b のようなタンパク質複合体の場合、複合体を形成しているかどうかは FRET によって調べることができるが、ドメイン間の相対配向を調べる方法はほとんどない。

われわれは二次非線形分光を利用して、完全な構造情報を得るのが困難なタンパク質に対して、完全ではないが役に立つ構造情報を与える新しい方法の開発を試みている。われわれがこれまでに開発したヘテロダイン検出電子和周波発生 (HD-ESFG) 分光法は、界面の分子の上下の向きを決定できるユニークな方法である。この HD-ESFG を、例えば図 1a のような膜タンパク質のセグメントごとに適用することが出来れば、膜配向性をはっきりと決定できる。さらに第二高調波発生 (SHG) の偏光依存性を測定すれば、各セグメントの配向角を決定することが出来る。このような HD-ESFG と SHG をセグメントごとに適用する方法は、図 1b のような複合体を形成するドメイン間の相対配向に対しても有効である。

今回われわれはこの新しいアプローチの要素技術を開発し、その有効性を検討した。具体的には、(1) 特定のセグメントだけを HD-ESFG (または SHG) アクティブとする

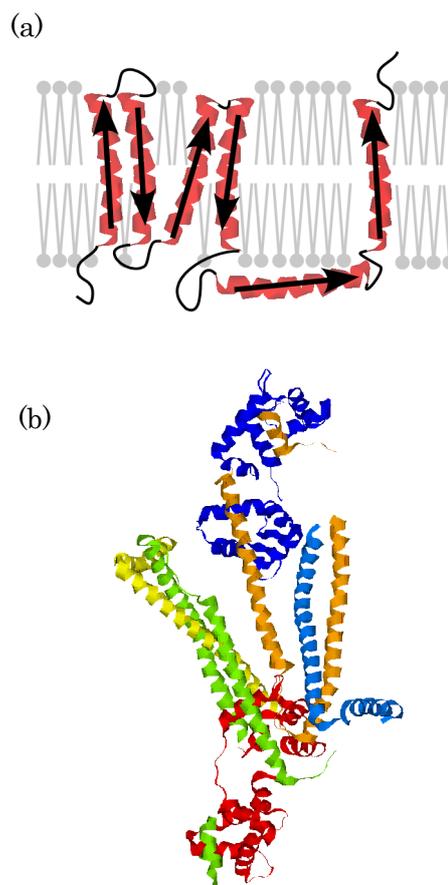


図 1 (a)膜タンパク質と(b) 6個のドメインからなるタンパク質複合体の模式図

方法、(2) タンパク質の配向膜の作製法、(3) HD-ESFG によるセグメントの上下の向きの決定法、(4) SHG による配向角の決定法、である。以下に各段階について詳細を述べる。

**(1) 特定のセグメントだけを HD-ESFG アクティブにする方法** アミノ酸には HD-ESFG の観測波長範囲 (350-470nm) に吸収帯がないため、通常のタンパク質は HD-ESFG 信号を与えない。そこで、タンパク質中の目的のセグメントを構成するアミノ酸の一つをミューテーションによりシステインに置換し、システインとマレイミド基の反応を利用してクマリン色素を導入する (図 2)。ミューテーションによる色素の導入は分子生物学分野において確立した技術であり、タンパク質の機能は損なわれない。大きな超分極率を持つクマリンは HD-ESFG 測定に適したプローブであり、クマリンを導入したセグメントのみを、HD-ESFG アクティブにすることができる。天然状態でシステインが含まれているタンパク質に関しても、そのシステインが立体構造保持に寄与していない場合は他のアミノ酸に置換して除くことができる。このため、本方法はほとんどのタンパク質に適用することができる。分子力学計算の結果によると、 $\alpha$ ヘリックスセグメントに導入されたクマリンはヘリックスの長軸に沿うように結合しており、クマリンの上下の向きが決まればセグメントの上下の向きが決定できる。

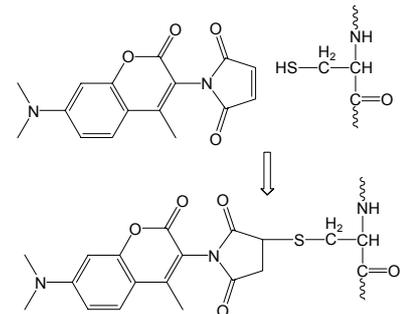


図2 システインとマレイミド基を持つクマリンの反応

**(2) タンパク質の配向膜の作製** タンパク質の特定の部分に tag を付けて膜と結合させることで、タンパク質が配向した膜を作成することができる。今回、大腸菌に発現させたタンパク質の精製法として一般的な His-tag 法を利用して、タンパク質配向膜を作成した。His-tag はタンパク質の末端に付加した複数のヒスチジンであり、 $\text{Ni}^{2+}$  イオンと特異的に結合する。そこで、 $\text{Ni}^{2+}$  イオンを表面に修飾したガラスの上に His-tag を介してタンパク質を配向させて HD-ESFG、および、SHG 測定試料とした。 $\text{Ni}^{2+}$  イオン表面修飾したガラス基板は、熔融石英ガラスをシランカップリング剤、nitilotriacetic acid 誘導体と塩化ニッケルで処理して作成した。

**(3) HD-ESFG によるセグメントの上下の向きの決定法** HD-ESFG 測定により二次非線形感受率 ( <sup>(2)</sup> ) の実部と虚部のスペクトルが得られる。ホモダイナミクス測定では得ることのできない ( <sup>(2)</sup> ) の複素位相には、分子配向についての情報が含まれており、配向したタンパク質の各セグメントの上下の向きを決定することができる ( 原理の詳細は 4P086 に記載 )。

**(4) SHG による配向角の決定法** 入射基本波の偏光方向を変えながら SHG 信号光の強度変化を測定することによって、 ( <sup>(2)</sup> ) のテンソル成分を決定する。その結果からセグメントの配向角の情報を得ることができる。

(1) - (4) により、完全な構造情報を得るのが困難なタンパク質について、リボンモデルやシリンドラモデルで表示できる、完全ではないが役に立つ構造情報を得ることができる。実際、膜タンパク質のセグメントのモデルである、 $\alpha$ ヘリックスを形成する 21 アミノ酸ペプチドにこの方法を応用し、その有効性を確認した。