

## ヘテロダイン電子和周波発生分光法を用いた タンパク質トポロジー決定法の開発

(東邦大・理<sup>1</sup>, 理研・田原分子分光<sup>2</sup>, 福井大・医<sup>3</sup>, 東邦大学複合物性研究センター<sup>4</sup>)

○細井晴子<sup>1</sup>・山口祥一<sup>2</sup>・田林沙織<sup>1</sup>・双木泰斗<sup>1</sup>・上村康裕<sup>1</sup>・渡邊総一郎<sup>1,4</sup>・

清水啓史<sup>3</sup>・田原太平<sup>2</sup>

【序】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。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に関して精密な構造情報が得られる。しかし、結晶化しにくい膜貫通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、精密な構造情報を得ることは通常難しい。そのような場合、リボンモデルやトポロジー図のような“完全ではないが役に立つ”構造情報だけでも重要な情報となる。

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進めている。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<sup>1</sup>。この HD-ESFG を、例えば図1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。

この新しいアプローチは、次の3つの過程から構成される。まず、(1) タンパク質の特定のセグメントだけを HD-ESFG アクティブとし、(2) タンパク質の配向膜を作製して、(3) HD-ESFG 測定によりセグメントの上下の向きを決定する。われわれは以前、このアプローチの有効性を報告した<sup>2</sup>が、(1)の過程により、決定された向きにあいまいさが残ることが分かってきた。

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だけを HD-ESFG アクティブな色素でラベルして色素の向きを決定し、色素の向きをセグメントの向きとする。われわれは以前、目的のセグメントを構成するアミノ酸の一つをシステインに置換し、システイン側鎖と特異的に反応するマレイミド基を持つ色素を結合させることで、セグメントを HD-ESFG アクティブとした。しかし、セ

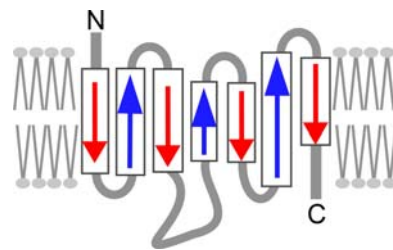


図1 タンパク質のトポロジー図

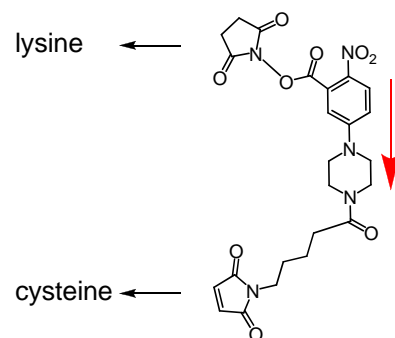


図2 クロスリンカー色素の構造と向き

グメントと色素は一ヶ所でのみ結合しているため、色素の向きとセグメントの向きが平行になる保証はなかった。

そこで、確実にセグメントと色素の向きを平行にするためには、セグメントと色素を二ヶ所で結合させればよいと考えた。本発表では、新規の色素を用いることにより色素の向きを制御し、より精度の高いトポロジー決定が可能になったことをモデルタンパク質で実証したので報告する。

【実験】新規のクロスリンカー色素（図2）を設計・合成した。この色素は、ESFG アクティブである *p*-nitroaniline 構造をもち、また、システインと結合するマレイミド基と、リシンと結合するスクシイミジルエステル基をもつため、セグメント中のシステインとリシンの二ヶ所で共有結合することができる。また、モデルタンパク質として、 $\alpha$ -helix 構造をとる、システインとリシンを含む二種類の 30 アミノ酸ペプチド、EIAALE**CE**IAALE**KE**IAALERHHHHHHHHH (“Up”)と、EIAALE**KE**IAALE**CE**IAALERHHHHHHHHH (“Down”) を作製した。“Up”と“Down”の違いはシステイン(C)とリシン(K)の位置が入れ替わっているだけである。9 個のヒスチジン (H) は、タンパク質をガラス基板に配向させるタグとして付加した。この二種類のモデルタンパク質のそれぞれにクロスリンカー色素を反応させた。また、ガラス基板表面にヒスチジンタグと特異的に結合するニッケル修飾を行った。得られた二種類のタンパク質-色素複合体をニッケル修飾ガラス基板に配向させて試料とし、HD-ESFG 測定を行った。

【結果】HD-ESFG 測定によって得られた“Up”と“Down”の二次非線形感受率 ( $\chi^{(2)}$ ) スペクトルの実部と虚部を図3に示す。 $\chi^{(2)}$  スペクトルの虚部の符号は、分子が上を向いているか下を向いているかを表す。虚部の符号は“Up”では正、“Down”では逆に負となっている。これは、“Up”と“Down”ではシステインとリシンの位置が逆になっているため、クロスリンカー色素が逆向きに結合していることに対応している。つまりこの結果は、クロスリンカー色素を用いることによって、色素とセグメントの向きを完全に制御することが可能になり、より確実にセグメントの向きを決定できることを意味している。本手法は、ただちに膜貫通タンパク質に適用することが可能であり、他にも、タンパク質複合体を構成するドメイン間の相対配向決定にも有効であると考えている。

【参考文献】[1] S. Yamaguchi and T. Tahara, *J. Chem. Phys.* **129** (2008) 101102. [2] 第2回分子科学討論会, 3C17, 2008年9月.

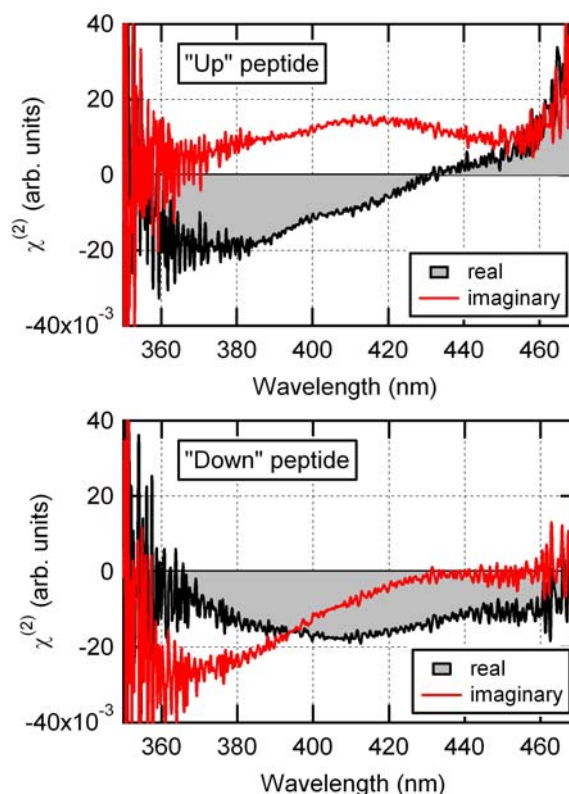


図3 二種類のモデルタンパク質配向膜の $\chi^{(2)}$ スペクトル