

3P091

変性状態におけるプロテイン A の二量子コヒーレンス ESR 法を用いた構造解析
(東北大多元研¹⁾、東大院²⁾) ○阿部 淳¹⁾、新井 宗仁²⁾、大庭 裕範¹⁾、高橋 聡¹⁾、山内 清語¹⁾

【序】 タンパク質フォールディングの分子機構を理解することで、未知タンパク質の構造予測やフォールディング病の対策など多くの応用が期待できる。100 残基以下の単ドメインからなるタンパク質のフォールディングは、天然状態と変性状態の二状態の平衡で示される (図 1)。ここで、変性状態におけるタンパク質は、ランダムコイルの性質を持つと考えられていた[1]。しかし、近年になって変性状態における残余構造の存在を示唆する報告[2-3]が多くなされるなど、ランダムコイル仮説に対する疑問も投げかけられている。

このためタンパク質フォールディングの出発点である変性状態の構造情報

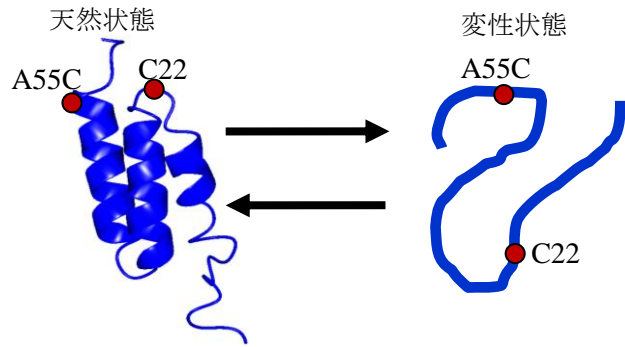


図 1 プロテイン A の天然状態と変性状態の二状態平衡

報は、フォールディング機構を理解するために非常に重要である。本研究では、フォールディング研究のモデルタンパク質の一つであるプロテイン A[4]を対象として、部位特異的距離計測を可能とする二量子コヒーレンス ESR 法を用いて変性状態の構造解析を行った。

【実験】 プロテイン A の B ドメイン(プロテイン A)の 55 番目のアラニンをシステインに変異させた A55C 置換体にスピンラベル剤を反応させて、22 番目と 55 番目のシステインに二重スピン標識した (図 1)。全ての試料におけるプロテイン A 濃度は 70 μM とした。天然状態の測定では、150 mM NaCl を含む pH 7.0 の 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) 緩衝溶液を用いた。変性状態の測定には、天然状態の試料をゲルろ過により変性剤 (塩化グアニジウム、GdmCl) を含んだ緩衝溶液に交換し、4~6 M の GdmCl と 150 mM の NaCl を含む pH 7.0 の MOPS 緩衝溶液とした。室温 (298 K) における CW-ESR スペクトルの測定には、JEOL の JES-FE2XGS X バンド(9.5 GHz) CW-ESR 装置を用いた。また二量子コヒーレンス ESR の測定は、JEOL と共同で開発した Ku バンド(17.5 GHz) パルス ESR 装置を使用し、6 パルス系列で 64 ステップの位相サイクルを用いて 50 K で行った。

【結果】 はじめに、室温での CW-ESR 測定結果を図 2 に示す。

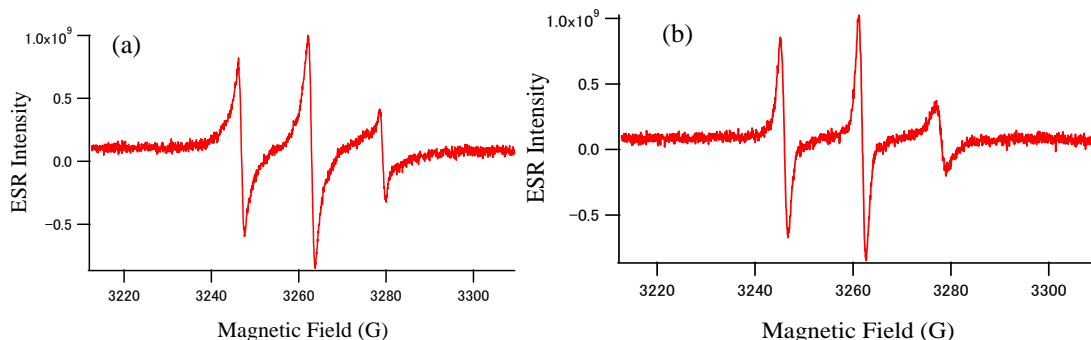


図 2 プロテイン A の CW-ESR スペクトルの測定結果 (a)天然状態 (b)変性状態 (6 M GdmCl)

図 2(a)と(b)の結果を比較すると、天然状態に比べて変性状態の ESR スペクトルの線形がシャープであることから、変性状態ではスピンラベルの運動性が大きいことが示された。また、GdmCl 濃度 4~6 M の範囲でスペクトルの線幅に変化がなかった（データ省略）ことから、スピンラベルの運動性に GdmCl 濃度は大きな影響を及ぼさないことがわかった。次に、二量子コヒーレンス ESR 測定の結果をフーリエ変換して得られたスペクトルを図 3 に示した。(a) に示した天然状態のスペクトルには、 ± 5.5 MHz にピークが見られることから、ラベル間の距離が 2.1 nm 程度であり、単一の距離分布を持つことが示された。一方で、(b) に示した変性状態のスペクトルは特徴的なピークを持たなかった。これは、広い距離分布を持つことを示している。また、GdmCl の濃度に依存してスペクトルの幅が異なることから、変性剤濃度に依存してラベル間距離の分布が変化することがわかった。これは、変性したプロテイン A の構造が変性剤濃度により変化することを示している。

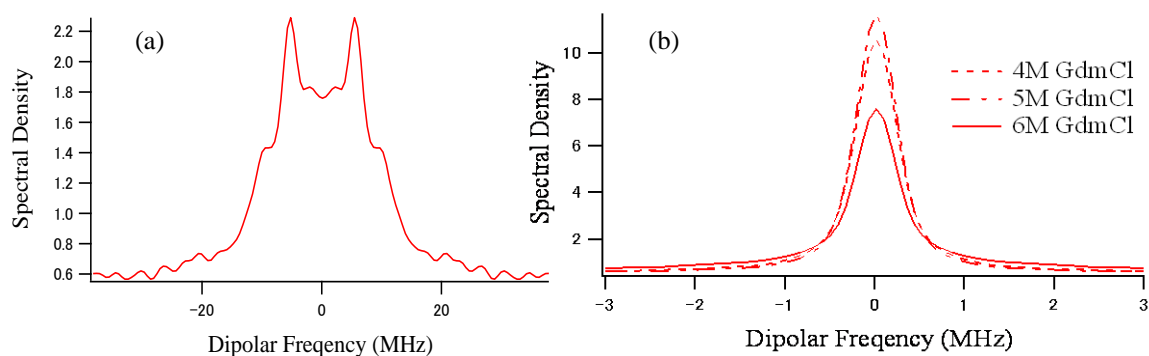


図 3 プロテイン A の双極子相互作用のスペクトル(a)天然状態 (b)変性状態

【考察】 以上の二量子コヒーレンス ESR を用いた測定結果は、変性したプロテイン A が多数の構造の集合体であることを明白に示している。本手法は、ラベル間の双極子相互作用のエネルギーがラベル間距離の 3 乗に反比例するため、時間分解蛍光エネルギー共鳴法 (FRET) [4] に比べて長距離も精度よく観測できる。また、分子構造の不均一性を敏感に検出できる。このため、本研究の結果は変性剤濃度に依存したラベル間の距離分布をより正確に反映していると考えられる。

これまでの研究から変性状態の構造については、二つの異なる主張がなされている。一つは、変性したタンパク質の回転半径が変性剤濃度に依存せず大きいままであるという X 線小角散乱の結果を基にした、「変性状態におけるタンパク質はランダムコイルの性質を持つ」という主張である[5]。もう一つは、変性剤濃度に依存して残基間距離が徐々に変化するという FRET の結果を基にした、「変性状態におけるタンパク質にも天然構造類似の局所構造が残存する」という主張である[6]。変性したプロテイン A の構造が変性剤濃度により変化するという本研究の結果は、後者の主張と一致する。今後、変性状態の構造の広がりやを定量的に理解するために、プロテイン A の不均一な構造の集合体をラベル間の距離分布から評価することが必要である。現在、変性状態における距離分布の定量的な解析を進めている。

【参考文献】 [1] Tanford, C. *et al* (1966) *JBC*, **241**, 1921, [2] Fitzkee, N. C. *et al* (2004) *PNAS*, **101**, 12497, [3] Shortle, D. *et al* (2001) *Science*, **293**, 487, [4] Huang, H. *et al* (2009) *Biochem.* **48**, 3468, [5] K. W. Plaxco *et al* (1999) *Nat. Struct. Biol.* **6**, 554, [6] Sherman, E. and Haran, G. (2006) *PNAS*, **103**, 11539