

時間分解熱力学で見る蛋白質反応と構造揺らぎ

(京大院理¹、大阪府立大院理²) 中曽根祐介¹、直原一徳²、徳富哲²、寺嶋正秀¹

Time-resolved study of structural fluctuation in protein reactions

(Kyoto Univ.¹, Osaka Prefecture Univ.²) Yusuke Nakasone¹, Kazunori Zikihara², SatoruTokutomi², Masahide Terazima¹

【序】現在、X線結晶解析やNMR測定により数多くの蛋白質構造が高い空間分解能で報告されている。構造情報を基に活性部位の特定や信号伝達経路が議論され、構造生物学が現在の生命科学を大幅に発展させたことは疑う余地がない。しかし、これら手法により報告される構造は時間平均された静的な構造である一方、実際の蛋白質分子は生体内や溶液中で熱的に絶えず揺らいでおり、この揺らぎが蛋白質機能に与える効果を忘れてはならない。例えば信号の入出力は揺らぎの為に確率的であるだろうし、揺らぎの変化自体が信号伝達を達成することがあるかもしれない。我々はこうした揺らぎの実測をテーマに研究に取り組んでいる。揺らぎは蛋白質の柔らかさと溶媒との相互作用に依存するため、両面からのアプローチが必要である。2P-084は蛋白質の柔らかさを実測しており、本研究は溶媒との相互作用を含めた全体像に関する研究である。

本研究で取り扱う phototropin は植物の光屈性を制御する青色光センサー蛋白質である。光受容を担う二つの LOV ドメインと活性化を示す kinase ドメイン、さらに LOV2 と kinase を結ぶ linker ドメインから構成される (図 1(a))。これまで我々は過渡回折格子法を用いて LOV2-linker 試料の反応検出を行い、機能に重要な反応を捉えることに成功してきた (図 2: linker に存在するヘリックスの解離・崩壊反応が光誘起される)¹。しかし、LOV ドメイン自体の構造変化は発色団周りに限られており、何故 linker ヘリックスが解離するのかという点は不明瞭であった。MD シミュレーションを用いた先行研究によると、明状態で LOV2 内部の H β -I β ループの揺らぎが増大すると報告されている (図 2(b))²。興味深いことに、このループは linker ヘリックスと隣接しているため、この揺らぎの増大により linker ヘリックスの解離が引き起こされるのではないかと予想される。これを実験的に検証するため、揺らぎの時間変化を熱力学観点から捉える事を試みた。

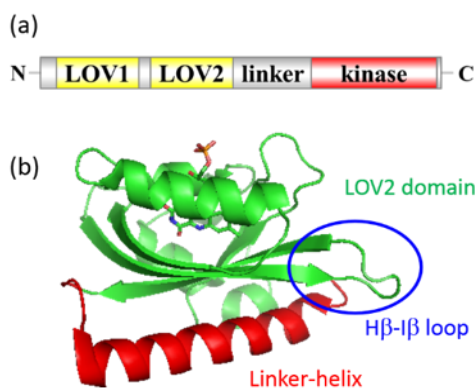


図1 (a) phototropinの一次構造
(b) LOV2-linkerの結晶構造

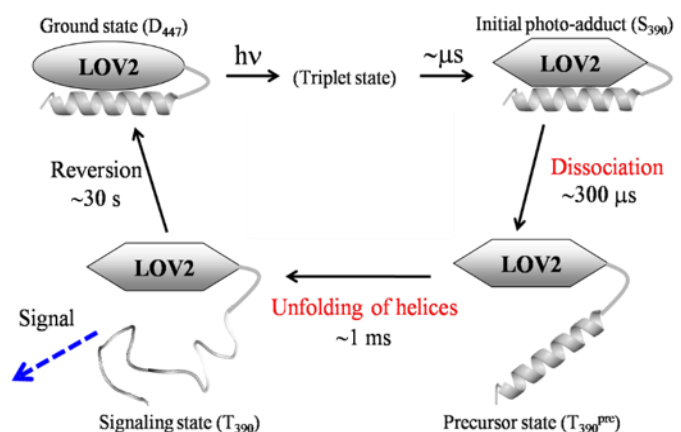


図2 LOV2-linkerの光反応

【実験】 熱力学量は様々な揺らぎを反映する有用な物理量である。アインシュタインの揺らぎの公式を出発点とし、いくつかの熱力学的公式を適用すると右

$$\begin{aligned} \langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle &= k_B T V \beta_T & \beta_T: \text{等温圧縮率} \\ \langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle &= k_B C_P & C_P: \text{定圧熱容量} \\ \langle (SV - \langle S \rangle \langle V \rangle) \rangle &= k_B T V \alpha_{th} & \alpha_{th}: \text{熱膨張係数} \end{aligned}$$

に示す3つの式が導かれる。これらの式が示すように圧縮率は体積揺らぎと関係づけられ、熱容量はエントロピーの揺らぎを表す。また熱膨張係数は体積揺らぎとエントロピー揺らぎの掛け合わせで表され、構造揺らぎの指標となる物理量である。したがってこうした熱力学量を反応中間体に対して測定することが出来れば、反応に伴う揺らぎの変化を捉えることにつながり、反応の駆動力や中間体の性質をより詳しく議論することが可能になる。我々はこれら熱力学量の変化を実時間で捉えるための手法として、過渡回折格子法と過渡レンズ法を併用した。

【結果】 各反応に伴うエンタルピー変化および体積変化の温度依存性を調べることにより、熱容量や熱膨張係数の変化を時間分解検出した(図3)。エントロピーの揺らぎは反応が進むにつれて増大する様子が観測されたが、これは初期反応(発色団の反応)およびヘリックスの構造変化によって内部に埋もれていた疎水性残基が露出したことを示している。表面に疎水性残基が露出すると疎水の水和が起こり、バルク水より弱い水素結合を形成し揺らぎが大きくなるためである。一方、構造揺らぎは初期過程において大きく増大し、最終過程においてはエントロピー揺らぎの増大から予想されるよりも小さい変化を示した。この初期過程における構造揺らぎの増大はシミュレーションによる先行研究を支持する結果であり、おそらくループ領域の揺らぎを捉えているのだろう。そしてこの揺らぎの増大が後に続く反応の駆動力となっていると考えられる。最終過程において構造揺らぎの変化が抑えられたことは、エントロピー揺らぎの増大を相殺するような負の体積揺らぎ変化が起こったことを示唆している。

さらに我々は熱量計を用いて定常状態における熱容量や熱膨張係数の測定を行った。その結果、絶対値に対してわずか5~10%程度の揺らぎの増大が光反応中に起こることがわかった。このような微小な揺らぎ変化を時間分解で検出し、反応の駆動力として評価したのは世界で初めてである。本討論会では以上の結果を基に揺らぎと機能のつながりを議論する。

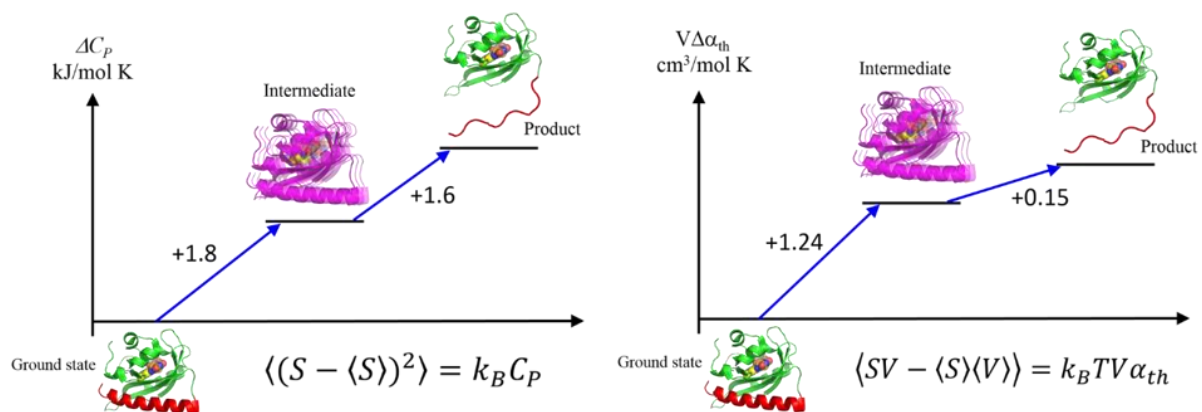


図3 LOV2-linkerの光反応に伴う(a)エントロピー揺らぎ、(b)構造揺らぎの変化

【参考文献】

[1] Nakasone et al. *J Mol Biol.* (2007) 367:432-42.
 [2] Freddolino PL et al. *Biophys J.* (2006) 91:3630-9.