

タンパク質反応における揺らぎと動的分子間相互作用

(京大院理) 寺嶋正秀

Fluctuation and dynamical intermolecular interaction during protein reactions

(Kyoto Univ.) Masahide Terazima

【はじめに】 生体の持つ生命機能の本質は、主にはタンパク質などの起こす効率的で選択的な、タンパク質間相互作用を含めた「化学反応」と言える。このように生命にとって大切なタンパク質であるが、その構造は「もろく」て、ちょっとした温度変化や pH 変化で変わってしまい(変性)、反応が起こらなくなる。なぜ大切な分子にもかかわらず自然はこのようにもろい分子を使っているのだろうか。また、タンパク質の化学反応は 1 つの分子で終わることなく、その情報がネットワークのように次々と伝わり、多くの分子の反応を変えることで進行する。こうしたタンパク質の化学反応やそれに続く信号伝達は、どのような要因でどのように起こっているのだろうか。こうした本質的な疑問に答えることは、分子科学の役目であろう。これまでも分子科学分野で開発された多くの手法で生体分子反応機構の解明が続けられている。我々は、「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、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。これらの方法を用いると、従来では検出できない中間体の存在やそのダイナミクスを解明でき、またこれまではわからなかった中間体の性質も明らかにができることがわかってきた。ここではそれらを用いたタンパク質反応研究の成果の一端を紹介する。

【時間分解熱力学とその応用】 科学創世の基盤となった熱力学と時間分解分光法は長らくほぼ分離された分野であったが、これを統合することで特に生体分子反応に対して多くの知見が得られることを示してきた。最近のその一つの例が、最初に示した疑問、「なぜ大切なタンパク質はもろいのか」という問いに対しての答えであろう。我々は、機能に関係するタンパク質反応にはもろさとほぼ同じ意味になる揺らぎが大切だと考え、それを実際の反応に対して証明することを試みた。原理的に熱力学量は揺らぎと密接に関係している。例えば、等温圧縮率 κ_T は、体積 V が圧力 P に対して変化する変化率 $\kappa_T = -(\partial V / \partial P)_T$ で定義され、体積揺らぎとは $\langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle = RT\kappa_T$ (R は気体定数、 T は絶対温度、 $\langle V \rangle$ は体積の平均量) の関係にある。つまり、圧縮率が大きいほど揺らぎが大きい。安定分子に対しては圧縮率(揺らぎ)が測定されてきたが、反応と揺らぎとの関係を証明するために必要な、反応の最中に揺らぎがどうなっているのかを見ることはできなかった。安定分子に対して十分な時間をかけても測定が困難であったためである。これに対して、反応に伴う体積変化の圧力依存性を時間分解で測定するため、少量の希薄溶液で定量性のよい過渡回折格子(TG)信号を圧力を変えて観測することのできる高圧セルの開発を行った。

ここで対象としたのは、生物の持つ青色光受容タンパク質のひとつである TePixD というタンパク質である。このタンパク質は単量体が 5 つつながって環状構造を作り、それが 2 つ重なり 10 量体を形成して存在する。発色団の光励起によって、発色団周りの水素結合ネットワークが変わっ

て、吸収スペクトルが赤色シフトする。その後は、吸収スペクトルに変化はないのだが、TG 法を用いた研究により、40 マイクロ秒の時定数を持つ体積膨張過程(構造変化)と 4 ミリ秒の時定数の 10 量体から 5 量体への解離過程であることが明らかとなっていた。このような劇的な反応をする TePixD であるが、円二色性スペクトルなどから観たその平均構造は光励起によってもほとんど変化がなかった。構造変化が見えないのに、なぜこんな大きな変化を示すのだろうか。そこに揺らぎが隠されていると考えたのである。

体積変化を表す信号強度から反応分子と中間体の体積差を求め、この量を種々の圧力(0.1 ~ 200 MPa)で測定した。その結果、圧力増加とともに基底状態と比べた中間体の体積がより負になることがわかった。圧力をかけると基底状態に比べて中間体の体積がより減少するということは、基底状態の圧縮率より中間体の圧縮率のほうが大きいことを示している。

また次の中間体ではさらに大きくなっていた。これは反応中間体で揺らぎが大きくなっている初めての証拠であろう。

さて、中間体の圧縮率が増加することがわかったが、この増大は実際に反応の駆動力になっているのだろうか。このことを確かめるため光強度依存性の測定を行った。以前の研究により、10 量体のうちの 2 つの分子を励起すると、この解離反応が起こらなくなることがわかっていたので、光強度を変えて圧力依存的な体積変化を調べた結果、光強度を増加して反応効率が減るとともに、圧力に対する体積変化が減ってくることがわかった。この光強度依存性から、反応しない場合の圧縮率変化を求めると、第 1 中間体においては基底状態よりも圧縮率が減っていることが分かった。すなわち、この結果は揺らぎが減るほど反応が起こらなくなること示しており、中間体で発生する「揺らぎ」がまさに反応を引き起こす駆動力であることを示している。この解明に伴い、圧力で揺らぎをコントロールすることにより反応効率を変化させられることを示すこともできた。鍵と鍵穴の関係から脱却した薬剤探求の指針にもなるかもしれない新しい方向性と考えている。

【時間分解拡散係数法】 どうすればタンパク質の反応ネットワークのダイナミクスである分子間相互作用の時間変化を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ことである。分子運動としての動きやすさは並進拡散係数で表される。拡散係数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、非常に有用である。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くためにはかなり時間がかかる。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が可能となった。この手法をタンパク質反応に適用したいくつかの例を示す。

【謝辞】 これらの研究は、研究室の中曽根助教や多くの学生、そして多くの共同研究者との成果である。また、新学術領域研究「揺らぎと生体機能」、「動的秩序と機能」の補助を受けました。ここに深く感謝いたします。

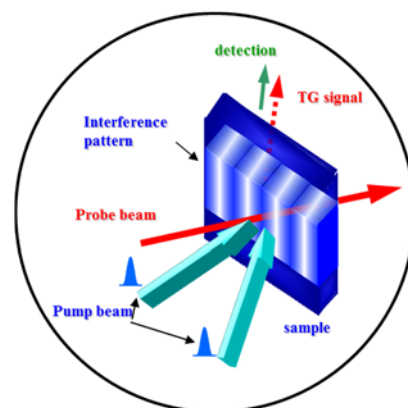


図: 過渡回折格子法