

## 回転拡散係数に対するタンパク質の二次構造変化の影響

(京大院理) 吉武智之・寺嶋正秀

### Influence of the secondary structure of proteins on its rotational diffusion coefficients

(Kyoto Univ.) Tomoyuki Yoshitake; Masahide Terazima

【序】一般的にタンパク質の機能はその構造によって決まると考えられており、タンパク質の機能に関する知見を得るためには、二次構造、三次構造および四次構造などタンパク質の高次構造とその変化を知ることが重要である。これらタンパク質の高次構造に関する知見を得るためにしばしば用いられているものとして、円二色性(CD)スペクトルがあげられる。現在では、多くのタンパク質の CD スペクトルのデータから経験的に二次構造を推測することができるようになってきている。しかしタンパク質反応における水分子の重要性を考えた時、そうした高次構造と共に水分子との相互作用も反映する物理量が望まれる。こうした観点で、並進拡散係数は興味深い。タンパク質の二次構造が壊れると並進拡散係数が減少することが示され、高次構造をプローブする物理量として使われるようになってきている[1,2]。これは高次構造が壊れることによりアミノ酸残基間で形成されていた水素結合が水分子との間で形成され、タンパク質-水分子間の摩擦が増加するためであると解釈されている。また、並進拡散係数の時間分解測定によって、構造変化ダイナミクスが追えることも大きな特徴であり、種々のタンパク質反応がこの手法によって調べられてきた[2]。このように並進拡散係数の測定例が積み重ねられてくると、次には分子の大きさや分子間相互作用を反映するであろう回転拡散係数は使えるのだろうかという疑問がわく。分子の回転拡散係数を記述した Stokes-Einstein-Debye の関係式によると、回転拡散係数は分子体積に反比例し、半径に反比例する並進拡散係数に比べてタンパク質の高次構造により敏感であると予想される。しかしこれまでタンパク質の並進拡散係数に関するデータは多数存在する一方、回転拡散係数の測定例は非常に少ない。その原因として、回転拡散係数測定の手法が非常に限られており、タンパク質の構造との関係性が十分に調べられていないことが挙げられる。本研究ではタンパク質の二次構造と回転拡散係数の関係を調べた。この関係を明らかにすることで、回転拡散係数の測定からタンパク質構造に関するより多くの情報が得られるようになると考えている。

【実験】本研究では、蛍光異方性解消法を用いてタンパク質の回転拡散係数測定を行った。蛍光異方性解消法による回転拡散係数測定の問題点として、一般的な蛍光プローブ分子の蛍光寿命(~ns)に比べ、タンパク質程度の大きさを持つ分子の回転拡散の起こる時間スケール(~50 ns)はかなり遅いため、回転緩和の観測が難しいという点があげられる。今回この問題点を解決するため、プローブ分子として長寿命(~370 ns)のルテニウム錯体(図 1)を用いた。この分子はサクシニミジルエステル基をもっており、タンパク質との混合によりラベリングが可能である。励起光として Nd:YAG レーザー(532nm)

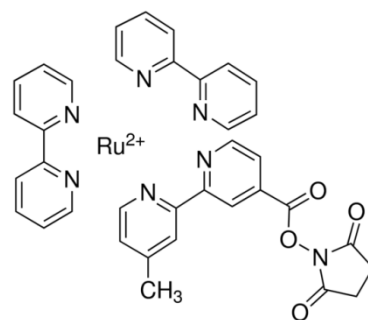


図 1. ルテニウム錯体の構造

を用い、検出波長は 677nm での測定を行った。ここでは対象タンパク質として Conalbumin (分子量約 75kDa)を用いた。タンパク質の二次構造と回転拡散係数の関係を調べるため、pH を変えて、二次構造量が異なる条件下で、回転緩和測定を行った。

【結果と考察】図 2 に pH を変えて測定した Conalbumin の CD スペクトルを示す。CD 強度より、タンパク質の二次構造量が pH によって変化していることが分かる。先行研究によると、この pH の低下に伴う二次構造量の減少は、天然状態の Conalbumin がモルテングロビュール状態へ変化することに対応する[3]。図 2 の pH 範囲内で、蛍光異方性解消法により Conalbumin の回転緩和測定を行った。(図 3)。異方性減衰信号は 2 成分の指数関数でフィッティングを行い、回転緩和の時定数を求めた。早い減衰が現れている原因としては、タンパク質に結合したプローブ分子が結合している軸を中心に回転している可能性がある。遅い成分がタンパク質の回転拡散を表していると考えられる。

図 4 に、pH を変化させて測定したタンパク質回転緩和の時定数と、222nm における CD 強度をプロットしたものを示す。pH が低下し、CD 強度が減少するに従って、回転緩和の時定数が増加していることが分かる。pH が 7 から 3 に低下した時の CD スペクトル強度の減少量は約 25% であり、回転緩和の時定数は約 2.3 倍になっている。並進拡散係数と二次構造の関係を調べた先行研究[1]では二次構造の 100%減少に対して並進拡散係数は約 0.71 倍になると報告されている。このことは回転拡散係数が並進拡散係数に比べタンパク質の二次構造変化に敏感であることを示唆している。

当日は、並進拡散係数と比較しつつタンパク質の二次構造と回転拡散係数の関係について議論する。

#### 【参考文献】

- [1] Inoue K et al. J.Phys.Chem.B (2005) 109, 22623-22328.
- [2] M.Terazima, Phys.Chem.Chem.Phys., 13, 16928-16940 (2011).
- [3]Rabbani G et al. Cell Biochem Biophys (2011) 61:551-560

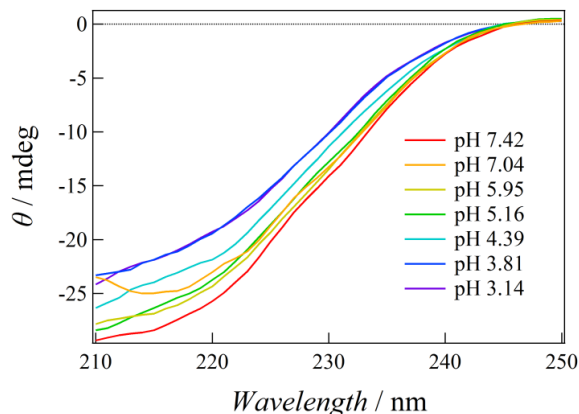


図 2. Conalbumin の CD スペクトル

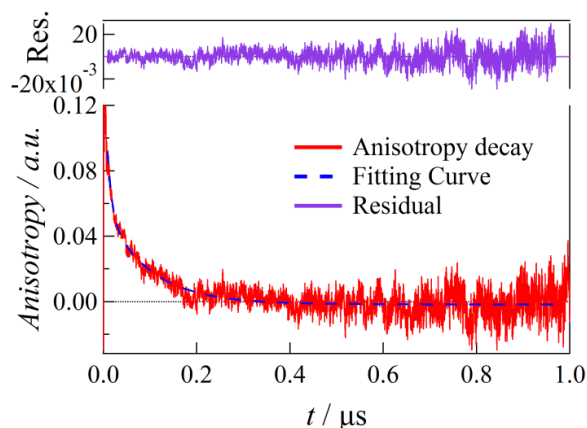


図 3. 異方性信号の減衰 (pH 4.40)

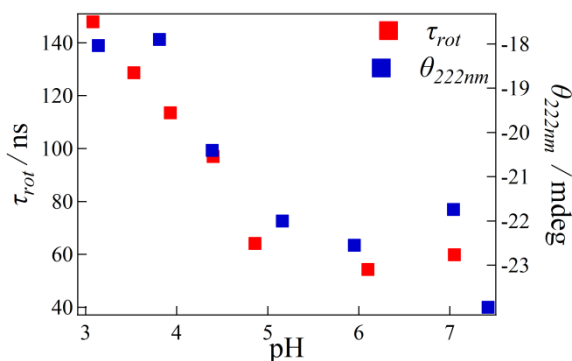


図 4. 回転緩和の時定数と CD 強度の関係