

レチナール蛋白質の反応速度分布

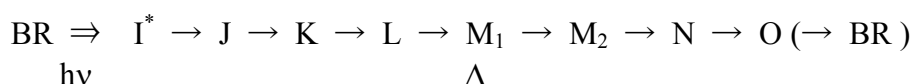
(北陸先端大・材料) ○水上卓

生体高分子は、水素結合や疎水結合などのゆるい結合力で複雑な構造を保っており、分子シミュレーション、NMR、1分子計測などの成果から、蛋白質が構造的に揺らぎつつ反応している描像が得られている。また蛋白質 folding の分野において揺らぎの重要性が注目されつつある。最近では、蛋白の揺らぎの特別な性質を解明しようとする動きもある。蛋白質の揺らぎが機能発現とどのような関係を持っているかについての研究の必要性が増している。

蛋白構造が揺らいでいるとするとそれが反応性に影響することが、当然考えられる。実験家の間では、蛋白の反応が、単純なモデルに合わない場合があることが暗に知られてきた。今回、蛋白質の時間分解分光法によるデータから、蛋白の機能発現における構造揺らぎの効果を抽出することを試みた。

レチナール蛋白質は、細胞膜貫通型の7本ヘリックス構造をもち、ビタミンAアルデヒド=レチナールが分子の中心部に結合している。近年の遺伝子解析により、この蛋白はホルモン受容体などとともにロドプシンファミリーと呼ばれる非常に大きなグループを成していることがわかってきた。細胞膜内外の物質移動・情報伝達のメッセンジャーなどの点で、構造・反応・機能における普遍性が着目されている。

レチナール蛋白質は発色団の光異性化をトリガーとし、それに誘起された蛋白質の構造変化により、フェムト秒から秒の時間スケールにおいて複数個の反応中間体をシーケンシャルに経て(熱崩壊過程)、蛋白としての機能を発現する。以下に、その一種である光駆動プロトンポンプ・バクテリオロドプシン(bR)の反応スキームを示す。



各大文字は中間体を示す。構造変化とともに発色団-蛋白質間の相互作用が変化するので、反応中間体はそれぞれ固有の可視吸収スペクトルを示す。この性質を利用し、低温分光法や時間分解分光法によって、詳細な反応解析が進んできた。

これまで行われてきた、バクテリオロドプシンの反応解析の戦略は、

- 広い時間レンジ($10^{-9} \sim 10^1 \text{sec}$)での時間分解吸収分光
- first order kinetics を仮定し、multi-exponential での近似
- exponential の個数と同数の中間体を想定、スペクトル成分を考慮して中間体の同定

であった。しかしこの方法では、観測されたスペクトル成分の個数よりも、近似に必要な exponential 関数の個数が多くなってしまう状況が頻繁に生じ、それはおもに、

• silent-intermediate (スペクトルが同じで時定数が異なる中間体)の問題としてとらえられてきた。

今回、蛋白質の構造揺らぎの効果を考慮し、反応速度が δ 関数型ではなくある程度分布

した形を考えた上で、

1) SVD(特異値分解)による V スペクトルの Gaussian 速度分布近似

2) MEM(最大エントロピー法)による速度分布の算出

という二つの手法で解析した。

バクテリオロドプシンが含まれている紫膜の水和フィルム試料をそれぞれ 245,250,255,260K に冷却し、長波長領域で励起後、740~300 nm(17 波長),0~360 sec (1 data/0.1 sec)の吸収変化を測定した。得られたデータは 17 波長×3600 点=61200 点である。このデータマトリクスに特異値分解(SVD: Singular Value Decomposition)をほどこした。SVDとは時間分解スペクトルデータを、波長×時刻の行列として用意し、その行列を対角化することによって、データ全体が持つ線形独立な次元の数(有効 rank 数)、および基底スペクトル(b-スペクトル)を算出する方法である。全波長の測定点が等価に扱われ、異なった波長でも同期した変化の成分が抽出されるために、非常に微細なスペクトル変化を見逃さずに扱うことが出来る。また、有効 rank 数によって、測定データから一意的に、独立したスペクトル変化の個数を決定することが出来る。このアプローチによって、実験データから、有効 rank 数 2~3 のスペクトル独立変化が得られた。これらの独立変化は、b-スペクトルから判断して M→N→O→BR の遷移に対応すると考えられた。つぎに時間変化に相当する V スペクトルを、有効 rank 数と同数の Gauss 分布した速度定数を仮定し、近似した。近似値の Gauss 分布は大きくオーバーラップし、分布のピーク位置は温度によってアレニウスの挙動を示した。

ここで問題になるのが、速度分布を恣意的に Gauss 関数で近似してよいのかということである。そこで分布関数を仮定しなくてもよい方法はないかと考え、天文学等で画像解析に使われる最大エントロピー法(MEM; Maximum Entropy Method)に着目した。これは、測定系に見込まれるノイズの標準偏差 σ をあらかじめ算出し、その標準偏差程度の誤差を許しつつ、速度分布の情報エントロピーを最大にするものを近似解とする方法である。情報エントロピー最大とは、その分布プロファイルが、標準偏差 σ の許す範囲で取りうる確率が最も高いことを示す。MEM では、400nm 単一波長での吸収変化から速度分布を求めた。得られた分布は大きくやはりオーバーラップした3つの Gauss 型関数によって良く近似された。また、SVD による結果と一応の consistency を示した。

これらの速度分布を、中間体の間に存在するエンタルピーバリアの分布によるものと考え、簡単なモデルによって計算すると、分布の半値巾はバリアの 2 割近い値を示した。このことはバクテリオロドプシンの反応において蛋白質が、同じ中間体の間でも異なった構造を(分布的に)取り、ひとつの中間体から次の中間体へ異なったそれぞれエンタルピーバリアを越えながら遷移していることを示唆している。

今回測定したキネティクスを従来どおり multi-exponential によって近似するには、有効 rank 数より多くの exponential 関数が必要であった。この結果に従来の手法を用いると同様に silent-intermediate が算出される。しかし今回の結果から、従来の silent-intermediate は discrete な速度=first order kinetics を仮定した事によるアーティファクトの可能性がある。

このアプローチによって、より少ない中間体の数で反応を説明できる可能性を示すとともに、中間体というカテゴリーについて、その境界分けの方法を提示することが出来るのではないかと考えている。