

2P049 拡散係数変化から見たタンパク質構造変化

(京大院理) 馬殿直樹, 寺嶋正秀

【序】 近年タンパク質結晶構造の情報が蓄積されるにつれ, 溶液中のタンパク質構造について多くの興味注が注がれてきている. 結晶状態と異なり溶液状態ではその構造を測定することは容易ではないが, 一つの方法として, 流体力学情報である拡散係数と関連づけることが考えられる. すなわち, 拡散係数は分子全体を特徴付けることができ, その形や大きさ, 周囲の分子との相互作用を反映する物理量であるため, 拡散係数は溶液中のタンパク質を理解するうえで非常に重要な情報を我々に与えてくれるであろう. これまで遠心沈降法, テイラー分散法, 動的光散乱法, パルス磁場勾配 NMR 法などをもちいて拡散係数が測定されてきている. しかし多くのタンパク質は非常に大きな分子であるため検出可能な距離を拡散するのに長時間かかり, 測定時間もそれにしたがって比較的長い. また, 装置の規模や複雑な解析などの問題もある. 我々は, これらの問題を克服するためにより短時間で簡便な拡散定数測定法として, 過渡回折光子 (Trangient Grating: TG) 法と光ラベル化剤とを組み合わせた手法を開発した. 測定手順は, まずサンプルタンパク質を微量の光ラベル化剤と混合した後レーザーパルスで 1 回当てただけである. これだけで拡散係数の導出に必要なデータを取ることができ, 測定に 1 秒かからない. われわれは本手法を多くの蛋白質に適用し得られた拡散定数を文献値と比較した. 加えて, DNA への応用も試みた.

また, タンパク質折れたたみ過程が溶媒相互作用とタンパク質構造変化を伴っていることを考えると, タンパク質構造変化を拡散係数変化から議論することは非常に重要であると思われる. そこで, タンパク質構造と拡散係数との相関を調べるために, その pH 変性過程が詳しく調べられている Horse Heart Myoglobin (Holo, Apo) について, 拡散係数の pH 依存性を測定した.

【実験方法】 <TG 法>: まず光反応性分子を含む試料溶液中に 2 本の励起レーザー光によって光強度の干渉縞を作る. この干渉縞によって励起分子と非励起分子とが空間的に分離される. ここにプローブ光をブラッグ条件を満たすように入射するとその回折光である TG 信号が観測される. その後励起レーザー光を切ると, 形成されていた分子空間分布 (濃度分布) が主に拡散により解消され, TG 信号の減衰が観測される [1a]. <光ラベル化剤>: 代表的な光感受性ヘテロ架橋分子である sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate: 図 2, 以下 HSAB) を用いた. タンパク質溶液に sulfo-HSAB を加えると, まず B 基がタンパク質の第一級アミンと反応して結合した後, A 基が光照射により活性化され非特異的にタンパク質と反応する [1b]. タンパク質には, Cytochrome c, Myoglobin, Lysozyme, Ribonuclease A, Trypsin, Albumin, Lactoalbumin の各溶液 (リン酸バッファー (pH=7.0, 10mM), 0.1M NaCl) を用いた. DNA には, Calf Thymus (CT), Salmon Testes (ST) を用いた.

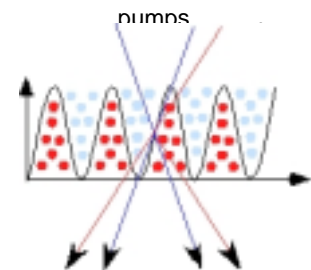


図 1. TG 法の概念図

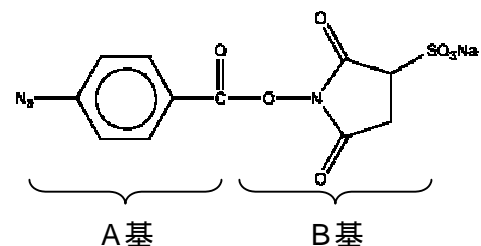


図 2. Sulfo-HSAB の構造式

【結果と考察】 タンパク質水溶液に HSAB を加えた場合の典型的な TG 信号を図 3 に示す。HSAB だけの場合に比べて、タンパク質が入るとシグナルの時間スケールが長くなり、DNA が入るとさらに遅い時間領域に新たな信号が出現した。いずれの信号も 2 成分指数関数フィットできた。

$$I_{TG}^{slow} = [\delta n_{rise} \exp(-D_{rise} q^2) + \delta n_{decay} \exp(-D_{decay} q^2)]^2$$

その結果、HSAB だけの TG 信号から、 $D_{rise} = 1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $D_{decay} = 3.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ と決定できた。タンパク質+HSAB の TG 信号では、 D_{rise} は変わらず D_{decay} が減少した。この最も遅い拡散がタンパク質由来であり、文献値[2]

に近い値を示した(表 1)。また DNA については、CT が $6.8 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、ST が $5.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ という値を得た。TG 信号の詳細な帰属は本研究の目的ではないが、(1) TG 信号の[HSAB] / [タンパク質]比率依存性、(2) ヘテロダイン TG 測定、(3) HSAB 以外の azido 化合物を用いた測定の結果、遅い拡散はタン

パク質に HSAB が非特異的に反応したものと帰属できた。タンパク質の分子量が数万であり HSAB が百程度であることや CD 測定結果から、HSAB の影響は無視できる。また、本手法により Holo, および ApoMb の拡散係数の pH 依存性を測定した(図 4)。CD 測定やトリプトファン蛍光測定等から、HoloMb は pH に対し 2 状態構造転移を、ApoMb は pH=4.0 付近で中間体をとる 3 状態構造転移を示すことがよく知られている。図 4 では $5.2 < \text{pH} < 7.0$ では拡散係数は天然状態のまま一定であるが、CD で 2 次構造が壊れ始めると拡散係数 D が増加するという結果が得られた。またさらに pH を下げていくと D の減少が観測された。これらは $5.2 < \text{pH} < 7.0$

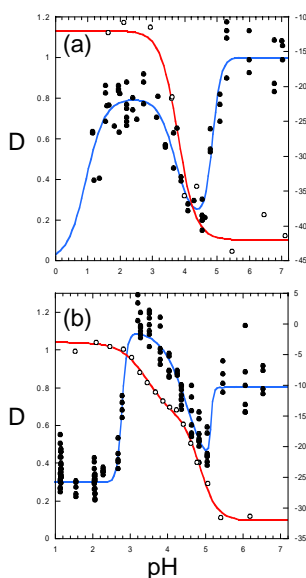


図 4. (a)Holo(b)ApoMb の拡散係数(●)と CD 値(○)の pH 依存性。フィットはシグモイド曲線。

が天然状態、その直後の D の減少が 3 次構造の崩壊、さらにその後の D の増加は 2 次構造の崩壊、 $\text{pH} < 3.0$ での D の減少はランダムコイル変性状態の会合過程を反映していると推測できる。小タンパク質において 2 次構造の崩壊は D の減少につながると考えられている[6]が、今回の D の増加はタンパク質表面の電荷による影響かもしれない。また、ApoMb では D の変化が、HoloMb に比べて高い pH で現れている。これは、HoloMb と ApoMb ではヘムの有無によるタンパク質構造の不安定化の効果があるためと考えられる。

【参考文献】 (1) (a) M.Terazima, N.Hirota, J.Chem.Phys.,98,6257 (1993), (b)M.Brinkley, Bioconjugate Chem, 3, 2-13 (1992), (2)"The Proteins," ed.by.H.Neurath, and K.Bailey, Academic Press Inc.,New York (1953), "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", 3rd ed., edited, by G. G. Fasman, CRC Press, Cleveland, vol. I-III (1976), et.al. (5) N. Baden, M. Terazima, Chem.Phys.Lett. in press (6) S.A.Rodgers-Sanders, D.V.Velde, C.K.Larive, Fresenius J. Anal. Chem. 369, 308-312 (2001)

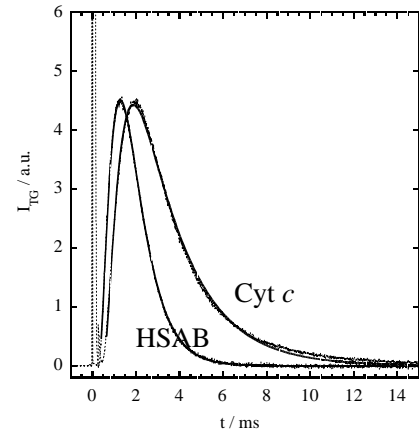


図 3. HSAB だけの TG 信号と HSAB+タンパク質の TG 信号

タンパク質	$D / 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$		分子量/ 10^3
	本手法	文献値	
CytochromeC	1.28	1.13-1.3	12.4
Myoglobin	1.14	1.0-1.1	17.8
-lactalbumin	0.86	1.06	14.2
Trypsin	1.10	1.1	24.0
Albumin	0.46	0.59-0.63	66.0
Lysozyme	0.95	0.86-1.19	14.4
RibonucleaseA	1.19	1.07-1.36	13.7

表 1. タンパク質の拡散定数