2P110

アポプラストシアニン蛋白質の折りたたみに伴う時間分解エンタルピー変化

(京大院理[1]、京薬大[2]、JST さきがけ[3]) ○馬殿直樹[1]、廣田俊[2,3]、寺嶋正秀[1]

【序論】多くの蛋白質は、その残基数から予想される構造が天文学的な数存在するにもかかわらず、適切な条件では唯一の天然構造にすばやく折りたたまる。この蛋白質フォールディング機構の解明は、分子科学的にも興味深いテーマであるし、変性蛋白質が原因とされている様々な病気の治療法開発のためにも非常に重要である。この折りたたみ機構を説明するために、現在ではファネルモデルが有力視されている。このモデルにおいて、フォールディングは、自由エネルギー（構造エントロピー以外のエントロピー成分とエンタルピー成分との和）が最小になるように進むと考えられている。したがって、折りたたみの研究では、その経路に沿った熱力学量変化の測定が重要となる。とりわけ、エンタルピー変化は、タンパク質構造形成に重要な、van der Waals 相互作用やアミノ酸側鎖間の水素結合の変化、あるいはアミノ酸側鎖と水の水素結合変化（水和効果）を反映するため、その実験的測定は重要な意義を持つ。我々は、折りたたみ過程の時間分解研究のために、化学修飾基導入で変性させた蛋白質をレーザーで光解離させることで折り畳みを開始させる手法[1]をとっているが、この手法ではフォールディングを瞬時に開始させることができる一方で、不可逆過程であるために、従来の熱力学測定で使われていたカロリメトリー法もファントホッフ法も使えない。そこで、今回我々は過渡回折格子（Transient Grating:TG）法を用いて、タンパク質フォールディングに伴うエンタルピー変化を時間分解で測定することを試みた。TG 法はファントホッフ法と異なり、なんの仮定もなしに直接エンタルピー変化を測定できる。TG 法で測定できない長時間領域（数 100μs 以上）でのエンタルピー変化測定には過渡レンズ（Transient Lens：TrL）法を用いた。

【実験】TG、TrL 法は、溶質の光反応に伴う熱放出による溶液の屈折率変化を測定する手法である[2]。吸収した光エネルギーを全て熱として放出する熱参照物質と、それと同じ吸光度を持つ試料溶液を比較測定したとき、もし試料溶液中においてなんらかの吸熱($\Delta H>0$)あるいは発熱反応($\Delta H<0$)が起こると、溶媒中に放出される熱量が変化し、屈折率変化(δn_{sample})として観測される。この強度を、熱参照試料の強度($\delta n_{reference}$)と比較する事で、

$$\delta n_{sample}/\delta n_{reference} = 1-\varphi\cdot\Delta H/(h\nu_{355}) \qquad \varphi：反応の量子収率 \qquad (1)$$

の式を用いてΔHが計算される。用いた修飾タンパク質は、アポプラストシアニン（アポ Pc）であり、その修飾基をレーザー（Nd:YAG:355nm）で解離させて折りたたみを開始させた。また光解離しても構造変化を起こさない参照物質として、アポ Pc と同じ修飾基を導入したトリペプチド(Ac-Asp-Gly-Cys)を用いた。測定は 25℃で行った。

【結果と考察】以前の報告[1]で、25℃において、変性アポ Pc(U)は 400ns で修飾基が光解離(U→U1)したあと、270μs で体積収縮（U1→U2：拡散係数 D(U1) = $0.80\times10^{-10}m^2s^{-1}$→D（U2) =0.45

×$10^{-10}m^2s^{-1}$)、23ms で拡散係数変化(U2→U3：D(U2) = 0.45×$10^{-10}m^2s^{-1}$→D(U3) = 1.15×$10^{-10}m^2s^{-1}$）を起こし、その後プロリン異性化に伴って天然状態へと巻き戻ることが、吸収、CD および TG 測定により分かっている。そこでまず、アポ Pc の折り畳み反応とペプチドの光解離について TG 測定を行った。図 1 に代表的なアポ Pc と熱参照物質の TG 信号を示す。(1)式を用いて、光解離(U→U1)のエンタルピー変化（ΔH_{diss})は、約 30kJ/mol の発熱（ΔH_{diss} <0）であることがわかった。

次に、体積変化(U1→U2)および拡散係数変化(U2→U3)に伴うエンタルピー変化（それぞれ、ΔH_{vol} と ΔH_D）を TrL 法により求めた。図 2 に代表的なアポ Pc の TrL 信号を示す。拡散係数変化ダイナミクスと熱拡散の寄与をコンボリューションすることにより TrL 信号をフィットして、25℃における ΔH_{vol} と ΔH_D を求めたところ、約 25kJ/mol の発熱（フォールディングで見れば負のエンタルピー変化）と約 10kJ/mol の吸熱（フォールディングで見れば正のエンタルピー変化）であった。

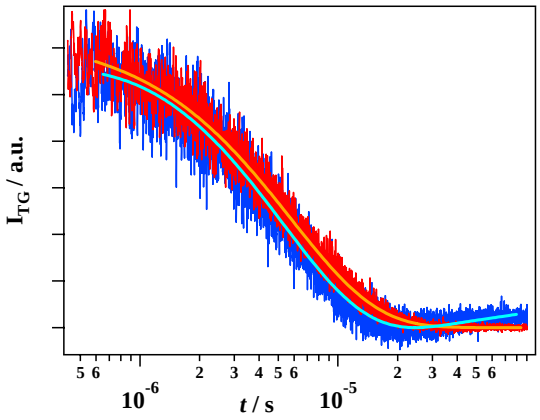

図 1　アポ Pc(青)と熱参照物質(赤)の熱 TG 信号

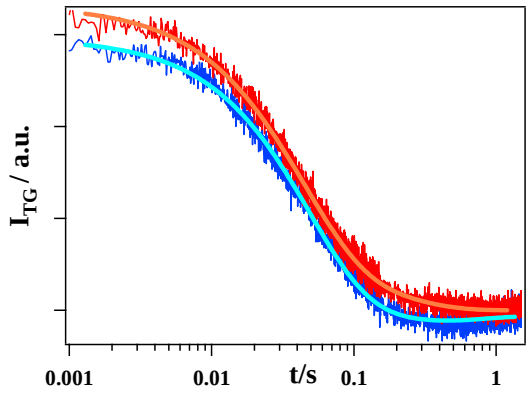

図 2　アポ Pc(青)と熱参照物質(赤)の TrL 信号

フォールディングによるエンタルピー変化には多くの寄与が含まれるが、これまでに、アミノ酸側鎖間の水素結合や van der Waals 相互作用形成のエンタルピー変化は負であり、アミノ酸側鎖（とくに親水性）と水との相互作用(脱水和)は正であることが報告されている [3]。このことと、体積収縮過程(U1→U2)において拡散係数の減少が見られることから、変性状態では疎水性残基によって水との相互作用が邪魔されていた親水性残基が、アポ Pc が van der Waals 相互作用形成に基づく疎水核形成（負のエンタルピー変化）することで、溶媒との相互作用が促進された（拡散係数の減少）と考えられる。また、拡散係数変化過程(U2→U3)では、親水性アミノ酸側鎖－水分子間相互作用がアミノ酸側鎖間の分子内水素結合形成に組み変わることで、拡散係数が増加したと考えられる。この過程(U2→U3)において正のエンタルピー変化が観測されたことから、このときはまだ native-like な分子内水素結合は形成されておらず、その後のプロリン異性化でそれが形成されると考えられる。

【参考文献】[1] S. Hirota, Y. Fujimoto, J. Choi, N. Baden, N. Katagiri, M. Akiyama, R.Hulsker, M. Ubbink, T. Okajima, T. Takabe, N. Funasaki, Y. Watanabe, and M. Terazima, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7551 (2006) [2] M. Terazima, *J.Photochem.Photobiol.C*, **24**,1 (2002).[3] G. I. Makhatadze and P. L. Privalov., *Adv. Protein Chem..*, **47**, 307-425 (1995)