

分子拡散から見る蛋白質の構造変化ダイナミクス

Khan Javaid Shahbaz、針貝美樹、今元泰、片岡幹雄、○寺嶋正秀

京大院理・奈良先端大

mterazima@kuchem.kyoto-u.ac.jp

[序] 蛋白質が働く室温溶液条件下で、反応と共にどのような構造変化が起こっているのか、あるいは水と蛋白質との相互作用がどのように変わって進行しているのかという問題を感度よく時間分解で検出できる方法は、現在までに多くの分光法が開発されてきてはいるが、まだほとんど存在しないといってよいであろう。最近、京大のグループでは蛋白質の拡散係数(D)がコンフォメーション変化をよく反映する量であることを認識し、その時間分解測定からそうした情報を得ることに取り組んでいる。蛋白質反応中間体と拡散係数の問題で興味深いのは、Photoactive Yellow Protein (PYP)の光反応である。これは蛋白質の反応中間体で基底状態と拡散係数が大きく異なることをはじめて見出した例でもある。この現象を発見した当時は、どうして反応中間体で拡散係数減少が起こるのか分からず、未解決で終わっていたのだが、その後、蛋白質の折りたたみ反応で大きな拡散係数変化が見出されたことや、蛋白質の変性曲線と共に D がいかに変化するかという問題について調べるうちに、ヘリックス構造が壊れるときにかなり大きな D の減少が見られることが分かってきた。この知見を元に、PYP の反応を考えると、反応中間体でヘリックスが壊れる過程があることが予想される。実際、奈良先端大のグループにより、中間体の寿命を延ばすような変異体を用いることで、pB の慣性半径や CD の測定がなされ、N 末端部分にある α ヘリックスが壊れていることが示されている。本研究では、N 末端部分欠損 PYP について反応中間体の D 測定を行い、本当にこの部分の α ヘリックスの壊れが D を変えているのか、もしそうであるならばどの部分のヘリックスまで壊れているのかを D の変化として捕らえることを目指した。 α ヘリックスの変化を D 変化として検出できるならば、本 TG 法は、変異体を用いることなく時間分解でこうした情報を得ることができ、有用な手法として確立することができるであろう。

[実験] TG 実験の基本的セットアップは既報の通りである。

[結果] まず野生型 PYP を光励起した後の TG 信号の時間変化を図 1(a)に示す。速い時間スケールで観測される減衰と立ち上がりの信号は熱拡散と pR から pB への反応を反映した変化である。一番遅い時間スケールで観測される山形の信号は、分子拡散を反映したものであり、その符号から、立ち上がりが基底状態 PYP の拡散速度、減

衰が pB の拡散速度を反映していると同定されている。このように pB の拡散が pG よりも遅いために、2 つの指数関数で表される信号が観測されていると説明される。N 末端から 6 残基(T6)、15 残基(T15)、23 残基(T23)が欠如した PYP について同様の測定を行うと、図 1(b)~(d)に示すように、分子散を現す最期の山形の信号強度が N 末端を長く切断するに伴い徐々に減少していることがわかった。これは、pB と pG の D が近くなってきたために、2 つの拡散成分が打ち消しあって山形信号強度の減少として現れていると解釈される。実際に、この観測された信号を 2 つの指数関数でフィットすると、ほぼ完全に再現することができ、それぞれの状態での D 値を求めることができた。この値から、pB と pG の D 値の差は系統的に減少していることが分かった。明らかに、この変化量は N 末端にある α ヘリックスが欠如したために起こったものであり、pB 状態における α ヘリックスの壊れを示している。こうした結果より、PYP の構造変化と、 α ヘリックスの壊れの程度を見積もる方法についても報告する。

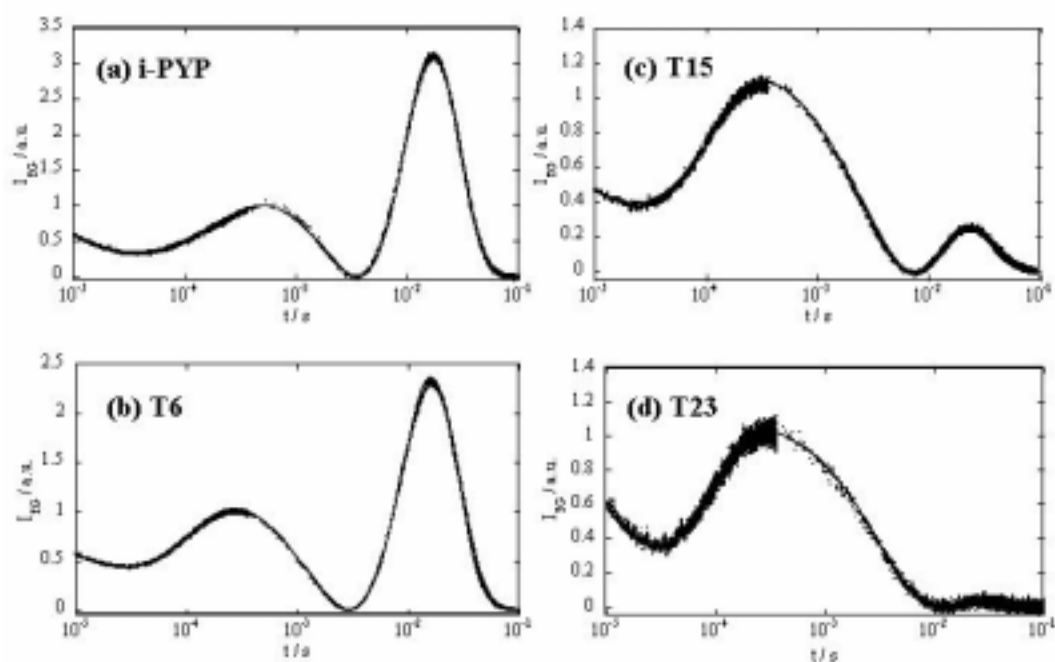


図 1 : intact PYP (a)および N 末端欠損 PYP((b)~(d))の TG 信号。信号強度は、pR から pB への反応を表す数 100 マイクロ秒の山形のピーク強度を 1 として規格化している。

参考文献： *J.Am.Chem.Soc.*, **122**,8524-8528(2000). *Biochemistry*, **41**,3037-3048(2002).