

学位論文の要約

題目 Development of a novel method for time-resolved-diffusion detection of protein reactions and its application

(時間分解拡散観測手法を利用したタンパク質反応検出法の開発とその適用)

氏名 寶本 俊輝

【1章 序論】

生体機能の解明には生体分子間の相互作用を理解することが重要である。その中でもタンパク質は外部刺激や分子間相互作用に伴いその構造を変化させ、機能発現に必要なシグナルを伝達させる。そのため、生体機能に関与するタンパク質反応を分子レベルで理解し、会合状態の変化や分子内部の立体構造変化を明らかにすることは重要な研究になる。本研究ではタンパク質分子の拡散係数 (D)に着目し、タンパク質反応における D の変化を時間分解で追跡するための手法の開発を行ってきた。 D は分子サイズの変化に敏感であり、会合状態の変化など大きな立体構造変化を捉える際に役立つ。

D を高速で測定でき、反応の時間分解検出に適用できる手法として、過渡回折格子 (TG) 法が利用されてきた。TG 法は測定対象の光反応を利用して対象分子の拡散を高速で測定できる (2章)。しかしながら、本手法は測定対象が光応答するものに限定され、多様なタンパク質反応研究への適用は困難であった。本研究では TG 法を拡張し、従来の TG 法では反応検出が困難な系へと適用できる、新しい時間分解拡散観測手法の開発を行った。TG 法の拡張は 1. ストップフロー法と TG 法の併用による測定系の確立 (3章)、2. タンパク質へのフォトクロミック分子修飾による拡散観測手法の確立 (4章)により達成した。更に、天然変性タンパク質の一つである α -Synuclein (α Syn)と界面活性剤との相互作用における構造変化のダイナミクスを明らかにするために、新開発した時間分解拡散観測手法を適用した (5章)。

【2,3章 拡張型 TG 法の概要とマイクロ流路における高速混合システムの開発】

光に依存しない様々なタンパク質反応を駆動するために、溶液の高速混合と急速停止によって反応検出を行うストップフロー (SF)法を TG 法と組み合わせた測定系 (SF-TG 法)の確立を行った。SF-TG 法では二種の反応液の高速混合で反応を駆動し、送液停止時点を基準に遅延時間を設けて TG 測定を行う。遅延時間を変えることでタンパク質反応の様々な時間でタンパク質の D を測定し、反応に伴う構造変化を D 変化として検出するのが本手法の概要である。タンパク質サンプルは貴重であり、サンプル消費が大きい SF 法ではサン

ル量の低減が重要である。本章の研究ではマイクロ流路と呼ばれる微小混合場での高速混合と送液の急速停止を行うシステム (μ -SF)の開発を行い、サンプル消費量などの低減に成功した。 μ -SF システムは市販の装置である RX-2000 (Applied Photophysics)と比較してサンプル消費量を 1/50 程度まで抑えることが可能となった。

【4章 拡散観測のためのタンパク質ラベリング法】

TG 法によるタンパク質の拡散観測において、光応答しない分子は拡散信号が検出されないという問題がある。そこで、タンパク質を拡散測定に影響しない程度の小さい光応答分子でラベルし、本来光反応しない対象に光応答性を付加することで測定対象の拡大を試みた。このようなラベル剤については先行研究でいくつか報告があるものの、拡散信号の強度が弱いなどの問題があった。本章の研究ではこれらに代わる新しい光応答性分子を見出した。本研究では新たに **spiropyran** の誘導体をラベル剤として使用した。**spiropyran** は閉環状態と開環状態の二状態を紫外光/可視光励起で切り替えられるフォトクロミック分子である。**spiropyran** でラベルしたタンパク質は TG 測定において拡散信号を容易に検出でき、先行研究で報告されたラベル分子の信号強度の 100 倍以上の強度で測定が可能になった。

【5章 α Syn と SDS との相互作用ダイナミクスの解明】

天然変性タンパク質に分類される α Syn は生体膜と結合し、N 末端側で α ヘリックス構造をとって構造変化することが知られている。生体膜は界面活性剤であるリン脂質で構成されるが、同じ界面活性剤の一種であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS)と α Syn が相互作用し、同様の構造変化を起こすことが報告されている。生体膜との結合を模倣できるとして、 α Syn と SDS の複合体の構造について多くの知見が得られてきたが、変性状態からの相互作用過程を追跡した例は少ない。そこで、新たに開発した SF-TG 法とタンパク質ラベリングを用いて、 α Syn の SDS 依存的な構造変化を時間分解で検出し、そのダイナミクスを研究した。 α Syn は **spiropyran** 誘導体でラベルし拡散測定を行えるようにした。 μ -SF システムで高速混合を行い、SDS 濃度を 0mM から 3mM にジャンプさせた所、SDS のミセルとの会合過程で D が顕著に変化することが明らかとなった。更に反応における円二色性や蛍光共鳴エネルギー移動の時間分解測定も行うことで、この D 変化を SDS モノマーとの会合が先立ち、ミセルとの会合が続いて起こる反応として帰属した。

【6章 総論】

本研究では SF-TG 法を開発し、タンパク質への **spiropyran** ラベリング法と組み合わせることで、様々なタンパク質反応における高次構造変化を捉えられる新しい時間分解拡散観測手法を確立した。本手法は α Syn と SDS の相互作用ダイナミクスのような分子間反応の研究に利用することが可能であり、今後こうした分子間反応のみならず様々なタンパク質反応研究に適用されることが期待される。