

レーザー分光を用いた時間分解熱力学量解析による  
蛋白質 - 蛋白質相互作用のダイナミクス  
Dynamics of protein-protein interaction detected by the time-resolved  
thermodynamical measurement based on a laser spectroscopy

井上 圭一・寺嶋 正秀  
京都大学理学研究科化学専攻  
Keiichi Inoue, Masahide Terazima

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

1. はじめに

物質の本質を明らかにする物理，あるいは物質を評価し変化させる化学において，熱力学はその状態の記述に大きな役割を果たしてきた．これは生命科学においても例外でなく，蛋白質の状態や溶媒と蛋白との相互作用を理解するための大きな分野であり続けている．一方でフラッシュフォトリシス法が報告されてから，多くの時間分解分光法が開発され，化学反応ダイナミクスを理解するために用いられてきた．レーザーの進展で，より短パルス光が発生可能となるに従い，ミリ秒からより短寿命のフェムト秒に至る過程が解明されつつある．こうした手法を用いて，化学反応がどのような中間体を経て，どのような速度で進行するかが明らかにされてきている．

このように熱力学と分光測定は，科学における両輪としてその進展に大きく寄与してきたし，また現在でも大きな分野として確立していると言える．しかしその関係に目を向けたとき，その間には平衡とダイナミクスという大きなギャップが存在することに気づく．もともと熱力学はシステムと熱浴からなる系で平衡状態を扱う学問である．例えば反応に伴うエンタルピー変化や体積変化という基本的な量は，平衡定数の温度変化や圧力変化より求められる．当然そのためには，平衡定数が測定可能でなければならない．しかし，反応を熱力学を用いて理解しようとするとき，熱力学量の時間発展すなわち非平衡系という平衡定数の求められない熱力学を考えなければならないのである．これまで熱力学量の時間発展という概念があまり無かったのみならず，こうした熱力学量を時間領域，特に反応論で扱われるピコ秒からミリ秒で測定する実験手法は存在しなかった．例えば，タンパク質の時間的な構造変化を引き起こす因子として，最も重要なものの一つがタンパク質の持つエネルギーの変化である．生体内のタンパク質は，光エネルギーや電気的なエネルギー

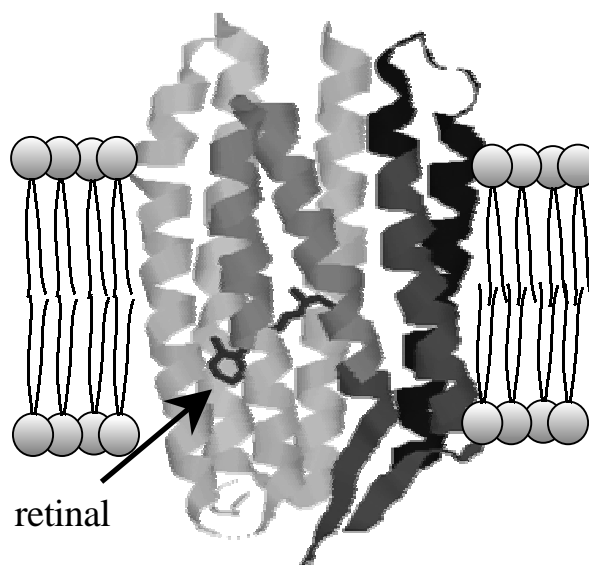


図1 センサリーロドプシン II の構造．  
発色団である retinal を矢印で示す．

により構造を変化させ、様々な生理機能の発現に役立っている。従って、タンパク質の時間的なエネルギー変化過程を研究することは、その根本にあるメカニズムに対して重要な知見を与えるものとして期待される。しかし、こうしたタンパク質の変化過程は非平衡的であり、これまではその反応に伴うエネルギー変化の測定は不可能であった。また仮に平衡な反応であっても、エンタルピー変化を測定するにあたっては、平衡定数の幅広い温度領域に渡る測定を行う必要があり、周囲の環境に敏感なタンパク質の生理学的な条件下における挙動を明らかにするには不向きである。一方で、分光学的手法では、その速度論については明らかにできるが、状態の理解と言う点では熱力学法に比べて無力であった。我々は最近、この2つの分野をつなぐための手法開発と蛋白質反応機構解明への適用を続けており、幾つかの新しい知見が得られている<sup>1-8</sup>。ここでは、この手法を用いた蛋白質-蛋白質間相互作用の時間分解観測についての研究例を紹介する。

生体内にある多くのタンパク質は、生理的な働きをするとき、構造を変化させ、それにより酵素活性をおこしたり、タンパク質間で信号を伝達することを達成している。これらのタンパク質で起こる構造変化がどのようにして発現されるのかということに興味をもたれ、その機構を明らかにするための様々な研究が行われている。その中で近年注目を浴びているのが、光受容もしくは化学受容タンパク質によって開始される、リン酸化カスケードを介した細胞内シグナル伝達である<sup>9</sup>。生体内で細胞は光や化学物質などの刺激を受け取ることによって、周囲の環境変化を知り、それに対応する生理学的な行動をとる。この刺激と行動の間を仲介するのが様々な生体物質間で行われる信号の伝達であり、生物学的、医学的に大きな興味を持たれている。こうしたタンパク質間の信号伝達のメカニズムを明らかにするには、分子論的な議論が必要不可欠であるが、*Halobacterium salinarum* のような古細菌の持つ光受容タンパク質であるセンサリーロドプシン II タンパク質 (SRII)<sup>10</sup> はそうした研究を行う時の典型的な系の一つである。このタンパク質は、細胞膜中に存在する膜タンパク質であり、発色団として全トランス-レチナールを持ち、7回の膜貫通型の  $\alpha$ -helix を持つ<sup>11, 12</sup> (図1)。このSRIIは青色光などの短波長の光が入射するとレチナールがトランス-シス異性化を起こし、それに引き続いてタンパク質全体の構造が変化し、最終的にサブ秒のオーダーで元の状態へと戻ってくるフォトサイクルを形成する<sup>13</sup>。SRII タンパク質は、同じ膜タンパク質であるトランスデューサータンパク質 (HtrII) へ、構造変化を介して信号を伝達する。更に HtrII はリン酸化カスケードにより下流のタンパク質へと情報を伝達し、最終的に細胞周辺にある鞭毛モーターの回転を変化させることによって、細胞にとって有害な近紫外の光を避ける運動をする。このように光をトリガーとして情報を受け渡す SRII と HtrII は分光学的な手法による研究に適している。また *Natronobacterium pharaonis* 内で見付かった、SRII と HtrII (pSRII, pHtrII) は、大腸菌を用いた大量発現が可能であり、より詳しい研究が行えるものとして期待されている<sup>14</sup>。ここでは、時間分解熱力学量という新しい観点から、この pSRII-pHtrII 相互作用がどの段階で起こるのかと言う点について検討した。

## 2. 原理と実験

時間分解熱力学量測定のためには、パルスレーザー誘起の過渡回折格子 (TG) 分光法を用いる。この手法によ

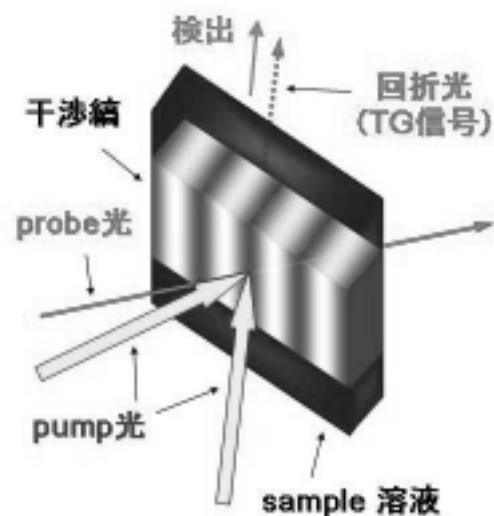


図2 過渡回折格子 (TG) 法の原理図

って始めて、仮定を設けずに時間分解熱力学量が測定できるようになった。また、TG 法はピコ秒から秒といった広い時間領域に及び測定が可能であり、幅広い時間領域で様々な変化を起こすタンパク質を研究する上では特に適した手法であると考えられる<sup>1-8</sup>。TG 法の原理図を図2に示す。サンプル用液中に同位相同強度の二本の励起光を交差させる形で入射し、溶液内に光の干渉縞によって正弦関数的な光の強度分布を作る。励起光強度の強い部分でより多くの分子が励起され、反応が開始される。励起された分子の構造変化やスペクトル変化、更に励起分子から放出された熱により、溶液の吸収率や屈折率が変化すると、この周期的な光学的変調は回折格子として働き、ここへ別のレーザー光（プローブ光）を入射することで回折光（TG 信号）が得られる。

この信号強度は、誘起された吸収率変化と屈折率変化の大きさを反映する。吸収率変化は、従来から多く行われていた過渡吸収と同じ情報を与える。屈折率変化の原因として、分子の体積が変化することによる屈折率変化、分子の吸収スペクトルが変化することによる屈折率の変化、さらに分子から放出された熱による屈折率変化の三つのものがあり、それぞれ体積グレーティング、ポピュレーショングレーティング、熱グレーティングと呼んでいる。また、前者二つを合わせて、化学種グレーティングと呼ばれる。熱グレーティングによる信号変化を測定することで、励起された分子から放出される熱量を測定することができ、中間体や生成物の励起前の分子の基底状態とのエンタルピー差 ( $H$ ) を測定することが出来る。また、分子の体積変化の時間分解測定により、生理学的条件下のタンパク質の構造変化を幅広い時間範囲で観測することが出来る。

今回我々は pSRII と pHtrII の間の信号伝達に注目するため pSRII 単体と pSRII と pHtrII の膜中部分 (pHtrII) を十残基程度のペプチドを介して結合させた pSRII-pHtrII を、界面活性剤に可溶化させたものを用いた。両者の比較を行うことでトランスドューサータンパク質と相互作用する段階についての検討を行った。

### 3. 結果と議論

#### 3.1. 過渡吸収法で見たダイナミクス

過渡吸収法によって、発色団（レチナール）周りの構造変化速度についての知見が得られる。これまでこの蛋白質について多くの研究が報告されており、まずこれらの研究との対応をつけるため、我々の実験条件でそのダイナミクスをモニターした。pSRII の吸収極大は 498 nm 周辺であるため、励起光としてエキシマレーザー励起の色素レーザーからの光（465 nm）を用いた。プローブ光には、

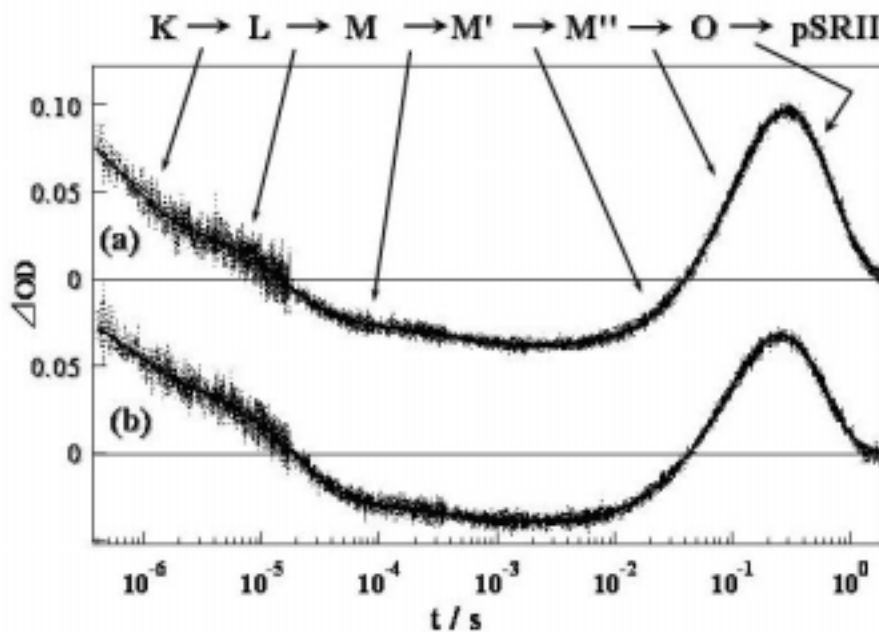


図3 過渡吸収の時間変化（点線）とフィット曲線（実線）(a) pSRII, (b)pSRII- $\Delta$ pHtrII. 各過程の同定を上記に中間体の記号と矢印で示す。

543.5 nm の光を用いた<sup>13</sup>．過渡吸収測定によって得られた結果を図3に示す．この時間変化は6個の指数関数成分の和で表されることが分かった．寿命と振幅を表1に示す．pSRIIは励起された後、ピコ秒程度の短い時間で初めの中間体を生成し、その後幾つかの中間体を経て最終的に基底状態へと戻ってくる．これらの中間体はバクテリオロドプシン<sup>15</sup>の中間体に倣って名前がつけられており、K中間体から始まってL, M... という名前が与えられている．過渡吸収測定で得られた信号の変化成分は、このような中間体の変化に対応しており、図3に示したような帰属を行った．このそれぞれに対応する中間体の構造はまだ報告が無いが、様々な分光法による研究の結果、図4に示したようなサイクルを描くものと考えられている．

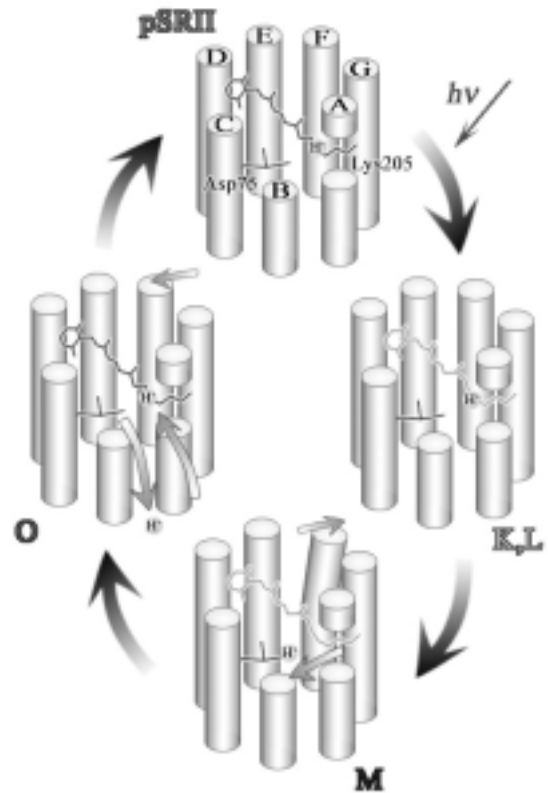


図4 センサーロドプシンIIフォトサイクル  
光がpSRIIに入射すると全トランスレチナルがトランス-シス異性化を起こし、K, L...中間体へと変化する．その後レチナルのシッフ塩基からAsp75残基へプロトンが移動すると、M中間体が生成される．更にAsp75から細胞外へプロトンが移り、シッフ塩基へ再度プロトンが受け渡され、レチナルがトランス型に戻るとO中間体になり基底状態へと戻っていくと考えられている．M', M''に対応する構造は明らかでない．

### 3.2.1 過渡回折格子(TG)法で見たダイナミクス

TG法を用いることで、2節で述べたような多くの物理量の時間変化が測定可能となる．そのダイナミクスは、当然発色団周りの構造変化だけをプローブする過渡吸収法から見たダイナミクスと異なってくる可能性がある．780 nmのIR光でプローブした、TG信号の時間変化を図5に示す．TG信号も過渡吸収信号同様に、数十ナノ秒から秒のオーダーで信号が変化している．この時間変化は、7個の指数関数成分の和で表された．過渡吸収信号から得られた成分より、一つ成分が多いが、これは光エネルギーを受けて励起された分子からの無輻射失活により放出された熱による屈折率の変化に対応する成分(熱グレーティング)が現れているためであることが分かった．この強度から、各中間体のエネルギーを求めることができるが、この点については以下(3.2.3節)で詳細に述べる．そこから決定された各々の変

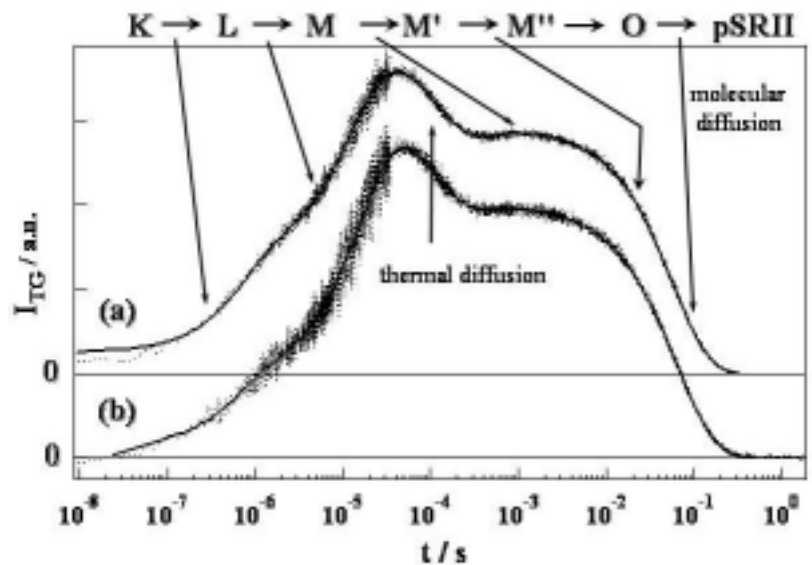


図5 過渡回折格子信号の時間変化(点線)とフィット曲線(実線)  
(a) pSRII, (b) pSRII-ΔpHtrII．各過程の同定を(a)に示す．

化成分の反応速度と振幅を表 1 に示す．これを見ると TG 法から得られた結果は過渡吸収法からの結果とほぼ同じであることが分かる．これは pSRII が分子量約 25kDa の巨大蛋白<sup>10</sup>で、吸収変化をもたらす発色団はそれに比べて非常に小さいことを考えると、意外な結果である．蛋白質構造変化が発色団周りの構造を変え、その吸収スペクトル変化として現れているものと考えられる．

トランスデューサータンパク質との相互作用する段階についての知見を得るために、pSRII に pHtrII が付くことによる影響を調べた．まず気が付くのは、最後の成分の速度が、pHtrII が付くことによって遅くなっている．これは反応速度が変化したためではなく、以下の(3.2.2 節)で述べるように分子の拡散速度が変化したためである．次に、L M, M' O, O 基底状態に対応する成分の振幅が pHtrII が付くことによって変化していることが分かる．これは、タンパク質からのエネルギー放出量に差があるためと、分子体積変化が変わったためである．これらの変化量より、分子の持つエネルギー(3.2.3 節)やタンパク質間相互作用(3.2.4 節)についての知見が得られる．

表 1 過渡吸収と TG 法で求められた pSRII と pSRII- $\Delta$ pHtrII の各成分の(a)寿命と(b)振幅

(a)		K	L	L	M	M	M'	M'	M''	M''	O
過渡吸収測定	pSRII	680ns		15 $\mu$ s		410 $\mu$ s		12ms		130ms	
	pSRII- pHtrII	610ns		26 $\mu$ s		390 $\mu$ s		12ms		100ms	
TG 測定	pSRII	720ns		18 $\mu$ s		370 $\mu$ s		8.5ms		130ms	
	pSRII- pHtrII	710ns		20 $\mu$ s		350 $\mu$ s		7.1ms		92ms	
(b)		K	L	L	M	M	M'	M'	M''	M''	O
過渡吸収測定	pSRII	7.8		9.0		1.8		1.5		-50	
	pSRII- pHtrII	4.9		7.3		1.1		0.76		-40	
TG 測定	pSRII	-1.1		-1.3		-0.25		-0.24		1.3	
	pSRII- pHtrII	-0.94		-1.9		-0.23		-0.22		0.59	

### 3.2.2 分子拡散運動

TG 法の大きな特徴の一つは、分子の空間的運動（拡散運動）が検出できることにある．これは、信号の由来である屈折率の空間変調分布が、分子の拡散運動により消滅すると考えれば理解しやすいであろう．空間変調分布が消滅するまでの時間は、干渉縞の間隔が広いほど分子が拡散によって長距離を動かなければならないため、長くなる．よって、励起光の干渉縞の間隔に応じて、分子の並進拡散による信号の減衰速度が変わるため、干渉縞の間隔によっては変化しない反応の速度と分離することが可能となる．干渉縞の波数を  $q$ 、分子の並進分子拡散定数を  $D$ 、分子の反応速度を  $k_{re}$  とすると、拡散方程式を解くことで、拡散成分の減衰速度  $k_{diff}$  は、 $k_{diff} = k_{re} + Dq^2$  で表されることがわかる<sup>1-8</sup>．

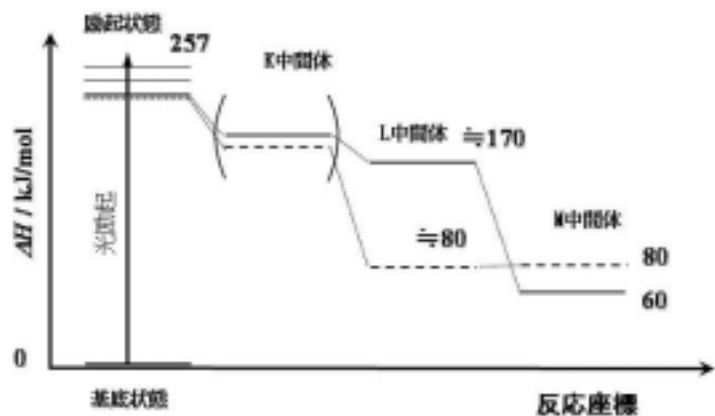
図 5 の TG 信号の最後の減衰成分は、分子の並進拡散による屈折率変化の減衰に対応している．拡散成分の減衰速度の  $q$  依存性から各々のサンプルの  $D$  を求めると、pSRII では  $3.4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、pSRII- pHtrII では  $1.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であった．Stokes-Einstein の関係式から、分子の  $D$  は分子の半径の逆数に比例することが知られているが、これによると界面活性剤に可溶化した pSRII- pHtrII の半径は pSRII の 2 倍近く大きいことになる．pSRII、pSRII- pHtrII の分子量はそれぞれ 25kDa、43kDa であるが、単純に分子の体積が分子量に比例すると考えると、この大きな  $D$  の差を説明することが出来ない．し

しかし、溶液中で pSRII- pHtrII が 2 量体を形成していると考え、この  $D$  の差をある程度説明することができる。これまで X 線構造解析<sup>12</sup> などから、細胞膜や結晶中では pSRII と pHtrII が 2:2 の複合体を形成していることが報告されているが、拡散係数の点から界面活性剤を含む室温溶液中でも細胞膜中と同様に pSRII- pHtrII が 2 量体を形成しているらしいことが分かった。このように、構造についての知見が得られにくい溶液中での情報が得られることは TG 法の大きいメリットである。

### 3.2.3 エネルギーダイナミクス

L M の過程において、TG 信号の振幅に pSRII と pSRII- pHtrII で違いが見られる。この時間領域には化学種グレーティングと熱グレーティングの二つの寄与が存在する。熱グレーティングの減衰速度は、熱拡散で決まり、先の節で述べた分子拡散と同様に、 $q$  を変化させて測定することで、他の信号からの分離が可能になる。様々な  $q$  における TG 測定を行ったところ、L M の過程では、pSRII と pSRII- pHtrII で化学種グレーティングの差はほとんど無いが、熱グレーティングの寄与が大きく異なることが分かった。このことは L M において pSRII では熱の放出があるのに対し pSRII- pHtrII ではほとんど熱は放出されず既に L の段階でタンパク質が安定化されていることを示す。この信号を

定量測定することで、L および M 中間体の基底状態からのエンタルピー差 ( $H$ ) を求めると図 6 のようになった。これをみると L 中間体において pHtrII が付くと 90 kJ/mol 前後の安定化が起きていることがわかり、両タンパク質の間でエネルギー的な相互作用が起きていることが示唆される。しかし、構造変化を反映する体積変化としては、トランスデューサーの有る無しで変化が見られず、L M が情報伝達ステップではないと思われる。



pSRII(実線)と pSRII-DpHtrII(破線)

### 3.2.4 蛋白質 - 蛋白質相互作用

pSRII と pSRII- pHtrII で大きな振幅の変化が確認された  $M^* O, O$  基底状態の過程では、化学種グレーティングの寄与しかない。また過渡吸収測定による吸収率変化の差も両サンプル間でほとんど無いことから、ポピュレーショングレーティングの差も少ないと考えられる。よって、この化学種グレーティングの振幅の変化は主に両サンプル間で体積グレーティングの大きさが違う、即ち体積変化の度合いが違うことに起因していると考えられる。屈折率変化の値より、 $M^* O$  の過程については pSRII と比べて pSRII- pHtrII の方が体積膨張していることが分かった。また  $O$  基底状態の過程においては逆に体積収縮を示していた。その変化の度合いを求めると、 $O$  基底状態において pHtrII が結合すると  $12 \text{ cm}^3/\text{mol}$  の収縮が起きていることが分かった。分子体積は蛋白の構造を敏感に反映する指標であり、トランスデューサーが付いた事により誘起される構造変化は、pSRII からの情報を pHtrII が受け取る過程に対応していると考えられる。またそれに対応して、表 1 から分かるように中間体の反応速度も変化している。

これまでの研究から pSRII の持つ  $\alpha$ -helix のうち pHtrII の膜貫通  $\alpha$ -helix と接している F-helix が、光

が励起すると外側に向けて動くことが示されており<sup>16</sup>、これに呼応する形で pHtrII の膜中にある helix が回転すると考えられている。今回測定された M<sup>2+</sup> O における pHtrII の膨張はこの過程に対応していると考えられ、基底状態においては F-helix との残基間相互作用によって動きが制限されていた pHtrII の helix の自由体積が増加したものと示唆される。

#### 4. おわりに

今回 TG 法を用いることで、これまで困難であった生理学的条件のもと、時間分解で初めてタンパク質間の相互作用が起こっているステップを明らかにすることに成功した。タンパク質のダイナミクスやタンパク質間の相互作用は非常に複雑なものであり、その全体の描像を得ることはこれまでの分光法だけでは限界がある。それに対して今回用いた TG 法のような分光学的手法を用いると、様々な熱力学量の測定を通して、それらに対する知見を得ることが出来る。現在こういった時間分解熱力学量測定分光法のタンパク質に対する応用は始まったばかりであるが、他の様々な系に対する応用が期待されており、更にサイト選択ミュートーションなどの生物学的手法と組み合わせることで、より詳しくタンパク質の性質やダイナミクスを明らかに出来ると考えられている。

#### 謝辞

テキサス大学の佐々木純博士、大阪大学の森崎雅世さん、徳永史生教授にはタンパク質試料のご提供と有用な議論をしていただきました。感謝いたします。

#### 参考文献

1. M.Sakakura, S.Yamaguchi, N.Hirota, M.Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, **123**, 4286-4294(2001).
2. Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, M.Terazima, *Biophys.J.*, **80**, 2922-2927(2001).
3. M.Sakakura, I.Morishima, M.Terazima, *J.Phys.Chem.B*, **105**, 10424-10434(2001).
4. K.Takeshita, Y.Imamoto, M.Kataoka, F.Tokunaga, M.Terazima, *Biochemistry*, **41**, 3037-3048(2002).
5. M.Sakakura, I.Morishima, M.Terazima, *Biochemistry*, **41**, 4837-4846(2002).
6. Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, M.Terazima, *Biophys.J.*, **83**, 1136-1146(2002).
7. K.Takeshita, Y.Imamoto, M.Kataoka, K. Mihara, F.Tokunaga, M.Terazima, *Biophys.J.*, **83**, 1567-1577(2002).
8. T.Nada, M.Terazima, *Biophys.J.*, **85**, 1876-1881(2003).
9. J. J. Falke, G. L. Hazelbauer, *TRENDS in Biochem. Sci.*, **26**, 257-265(2001).
10. W. Zhang, A. Brooun, M. M. Mueller, M. Alam, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 8230-8235(1996).
11. H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Science*, **293**, 1499-1503(2001).  
A. Royant, P. Nollert, K. Edman, R. Neutze, E. M. Landau, E. Pebay-Peyroula, J. Navarro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10131-10136 (2001).
12. V. I. Gordelny, J. Labahn, R. Moukhametzianov, R. Efremov, J. Granzin, R. Schlesinger, G. Büldt, T. Savopol, A. J. Scheldlg, J. P. Klare, M. Engelhard, *Nature*, **419**, 484-487(2002).
13. I. Chizhov, G. Schmies, R. Seidel, J. R. Sydor, B. Lüttenberg, M. Engelhard, *Biophys. J.*, **75**, 999-1009(1998).
14. K. -H. Jung, E. N. Spudich, V. D. Trivedi, J. L. Spudich, *J. Bacteriol.*, **183**, 6365-6371(2001).
15. I. Chizhov, D. S. Chernavskii, M. Engelhard, K. -H. Mueller, B. V. Zubov, B. Hess, *Biophys. J.*, **71**, 2329-2329-2345(1996).
16. A. -A. Wegener, J. P. Klare, M. Engelhard, H. -J. Steinhoff, *EMBO J.*, **20**, 5312-5319(2001).