

光解離性修飾基を用いたタンパク質の構造と機能の新規研究法

廣田 俊

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科

1. 研究のねらい

タンパク質が生体内で機能するためには、特定の高次構造を持つ折れ畳んだ状態を形成することが必須であり、実験と理論の両面からタンパク質の構造形成に関する研究が盛んになされている。ストップフロー法により比較的遅い時間領域でのタンパク質形成反応の理解が深まったが、ストップフロー法の不感時間内（約 1 ms）での反応に関しては、いまだ不明な点も多い。このため、1 ms よりも早い初期段階での構造形成反応を追跡する良い手法の開発が必要であった。そこで本研究では、種々のタンパク質に広く応用できる方法として、化学修飾により光解離性修飾基をタンパク質の特定のアミノ酸残基に導入する手法の開発を行った。この手法では、不安定化した修飾タンパク質にパルス光を照射して、タンパク質から修飾基を瞬時に外すことにより、タンパク質のフォールディング反応を開始させ、その反応を追跡した。またこの手法の応用として、新規光応答性ペプチドを開発し、タンパク質-ペプチド相互作用の光制御を試みた。

2. 研究成果

本研究では、緑色植物などの葉緑体中に存在する可溶性の電子伝達銅タンパク質であるプラストシアニン (PC) から銅原子を取り除いたアポプラストシアニン (apoPC) を取り上げた。PC は β シートタンパク質に分類され、8 本からなる 2 つの β シートと 1 回転の α ヘリックスを有し、タンパク質内の唯一のシステイン残基 (Cys84) は銅原子に配位している。Cys84 の硫黄原子は銅に配位しているため、PC から銅を外して得た apoPC の Cys の硫黄原子を、*o*-ニトロベンジル基のジメトキシ誘導体 (DMNB) で修飾した。リシルエンドペプチダーゼにより未修飾および修飾タンパク質の酵素消化を行い、各タンパク質から得られたペプチド断片を HPLC で精製し、それらの分子量を MALDI-TOF スペクトルにより測定した。修飾タンパク質に特異的に観測されたペプチド断片のアミノ酸配列解析を行うとともに、エルマン試薬との反応性を未修飾と修飾タンパク質で比較したところ、apoPC の DMNB 修飾部位が Cys 84 であることが特定された。

修飾 apoPC に 355 nm のパルス光を照射すると、修飾基に由来する 355 nm の吸収帯が減少したことより、光照射により修飾基が apoPC から遊離したことが判明した (図 1A)。一方、修飾と未修飾 apoPC の酸変性状態の CD スペクトルを比較したところ、修飾 apoPC は変性状態であることが解った (図 1B)。また、修飾 apoPC への 355 nm の光照射により、変性状態を示していた CD スペクトルはネイティブ状態の CD スペクトルに戻った (図 1B)。さらに、光照射前後の修飾 apoPC の ^{15}N -HSQC NMR スペクトルを測定したところ、光照射前の修飾 apoPC のスペクトルは酸変性のスペクトルと類似したスペクトルになり、光照射によりスペクトルはネイティブ状態のスペクトルに変化した。これらの結果より、光照射によりタンパク質が変性状態からネイティブの β シート構造の状態に戻ることが確かめられた。

次に、過渡回折格子法を用いて修飾タンパク質に光を照射したときの反応を追跡した。修飾タンパク質への光照射により得られた回折シグナルは、まず、強度が急激に増大し、その後、ゆっくり増大するようになり、マイクロ秒の時間領域

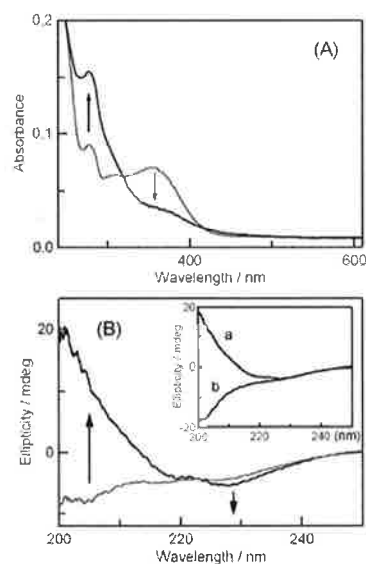


図 1. パルス光 (355 nm) 照射による DMNB 修飾 apoPC の (A) 吸収と (B) CD スペクトル変化 (挿入図: apoPC の CD スペクトル、(a) pH 7 と (b) pH 2)

で減少した。この減衰成分は、熱グレーティング成分であった。ゆっくり増大した成分のタイムスケールは 400 ns であり、この信号の形がグレーティングの波数を変えても変わらなかった。このことより、この成分は修飾基がタンパク質から解離するのに対応し、400 ns で修飾基がタンパク質から解離することが判明した (図 2)。照射後、約 270 μ s でタンパク質の体積減少が観測され、この体積変化は変性状態から初期段階での疎水基凝集への変化に帰属できた。さらに、23 ms のタイムスケールで拡散定数が増大することが解り、この変化はタンパク質と水分子の分子間水素結合がタンパク質内の分子内水素結合へと変化したことに対応すると解釈した。

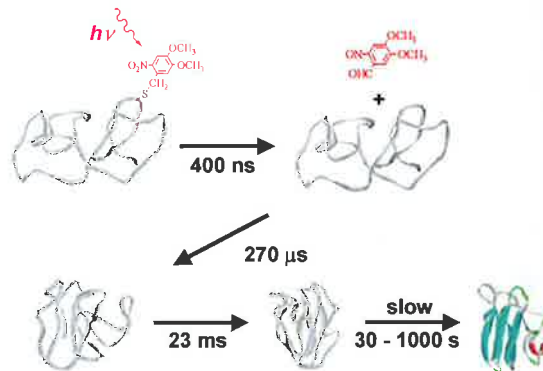


図 2. 修飾タンパク質への光照射による apoPC の折れ畳み反応の模式図

この手法の応用として、光応答性環状ペプチドを作製し、 β シート構造を有するホスファチジルイノシトールキナーゼの SH3 domain とその認識ペプチドとの相互作用の光制御を試みた。光解離性架橋修飾基でペプチドの 2 箇所を分子内で架橋させ、ペプチドを環状構造にした。得られた環状の修飾ペプチドに光を照射すると、ペプチドの環状結合が切れ、もとの天然構造のように揺らぎを有する構造を取ることが期待される。実際、タンパク質と修飾された認識ペプチドを共存させた場合、お互いに認識しなかったが、この混合溶液に光を照射するとペプチドと修飾基の結合が切れ、タンパク質とペプチドが相互作用を開始することが、CD スペクトルより確かめられた。

本手法は多くのタンパク質へ応用可能であり、タンパク質の構造と機能の有効な研究手段になると期待される。特に、これらの手法がタンパク質のフォールディング反応の解明や分子認識の制御に寄与することが考えられる。

3. 主な発表

論文

- ・ 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, Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7551-7558 (2006).

招待講演

- ・ Shun Hirota, Photo-Trigging the Folding and Molecular Interaction of Proteins, International Workshop on Protein Dynamics and Biological Applications of Time-Resolved Spectroscopy (Satellite Meeting of ICORS 2006), Kobe, Japan, August 18-19, 2006.
- ・ Shun Hirota, Control of Folding and Molecular Interaction of Proteins and Peptides by Photocleavable Modification, 2nd European Conference on Chemistry of Life Sciences (2nd ECCLSc), Wrocław, Poland, September 4-8, 2007.

4. その他

特許

- ・ 廣田 俊、濱崎 勇二、光制御ペプチド及び光制御ペプチドを用いたペプチド-金属複合体形成の制御方法、PCT/JP2006/316278、出願人：株式会社島津製作所
- ・ 廣田 俊、ハラシ・プラカシュ、アゾペプチド複合体、特願 2007-179592、出願人：奈良先端科学技術大学院大学

受賞

- ・ 平成 17 年度日本薬学会薬学研究ビジョン部会賞受賞、「蛋白質構造変化の新規測定法と制御法の開発」(2006 年 2 月)