総説

時間分解タンパク質間相互作用検出法とその応用

寺嶋正秀 京都大学大学院理学研究科

A new type of biosensor is presented for detecting protein-protein interaction in solution phase in time-domain. A fast time resolution was achieved by the diffusion measurement with the transient grating method. This technique allows us to study the inter-protein interaction of short-lived intermediate species. This biosensor possesses many unique merits compared with the traditional biosensors, such as the surface plasmon resonance biosensor, and the merits were discussed. We applied this technique to the detection of various intermolecular interactions of photosensor proteins; such as a reaction intermediate of photoactive yellow protein (PYP) and phototropins. Transient photo-induced association and dissociation of intermediates were detected.

time-resolved biosensor / photosensor / diffusion / intermediate

1. はじめに

生体科学において、タンパク質の機能を分子論的に明らかにすることは、大きな目標の1つであろう。一般的に、こうした機能発現のためには化学反応が必要であり、そうした反応の理解のためには、ダイナミクスの研究が必須であることはこれまでの科学の歴史からみて明らかである。しかし、格段の進展を遂げている静的構造や静的物性の解明と比べると、ダイナミクスの研究は遅れをとっており、反応ダイナミクスやタンパク質の揺らぎなど、タンパク質反応の時間変化を直接検出する新規検出法はこれから開発を急がなければならない課題といえる。特に、タンパク質の機能が、揺らぎも含めた高次構造変化とタンパク質-タンパク質相互作用で決まることを考えれば、こうした相互作用を検出するセンサーが、これからより必要になってくるのは明らかである。

もちろん、従来から免疫応答、シグナル伝達、レセプターリガンドアッセイなどを行うためのバイオセンサーの開発が行われており、いくつかの機器は市販もされている。たとえば、あるタンパク質がどういうタンパク質あるいはDNAと結合するかを知るために、質量測定バイオセンサーとして、タンパク質が会合することによる質量増加を測定する手法が開発されている。また、多くの研究に用いられている手法は、表面

プラズモン共鳴バイオセンサーであろう。これは、金属表面からの反射光が、表面プラズモンの吸収によってある角度のときだけ減少する効果を利用したものであり、非常に微量のタンパク質間相互作用を検出可能とする。このため、このバイオセンサーは、今まで複雑で解析の難しかった生体現象をモニタリングすることができることで注目されて、多くの研究に用いられている¹⁾。しかし、ターゲットとなるタンパク質を金属基板に吸着させる必要があったり、精密な温度制御が不可欠であるなどの欠点があった。最も大きな欠点は時間分解観測が困難という点である。信号伝達過程などは、不安定中間体がタンパク質-タンパク質相互作用を変化させて起こるので、短時間しか存在しない中間体に対するバイオセンサーが必要となってくる。タンパク質会合が吸収スペクトルに変化をもたらす場合には、過渡吸収などの分光学的な手法を用いることもできるが、実際には変化が少ない場合が多くて適用が困難であるし、またその変化が会合によるものかどうかの明確な区別をつけにくいことも多いであろう。また、蛍光エネルギー移動などの方法を用いるには、適切な位置にプローブ分子をつける必要があり、ターゲット探索のような場合には向かない。われわれは、溶液中で反応しつつあるタンパク質の高次構造変化やタンパク質-タンパク質相互作用を時間分解で観測できる広い意味でのバイオセンサーを開発したので、こ

A Time-Resolved Detection Method of Protein-Protein Interaction and Its Applications

Masahide TERAZIMA

Graduate School of Science, Kyoto University

ここで紹介する²⁾。

基本的な原理は、拡散係数の変化によりタンパク質会合を検出することにある。拡散係数とは、溶液中で分子がどれぐらいの速さで並進運動をしているかを示す値であり、タンパク質の構造や大きさによって変化する。タンパク質会合が起こると、その大きさが変化するので拡散係数が変化することは直感的にも理解できるであろう。しかしそれだけでなく、タンパク質の構造変化が起こっても、拡散係数が敏感に変化する事実をわれわれは見だし、これを利用することで、あるタンパク質と相互作用するタンパク質や、そのタンパク質構造を変えうる分子を探索できることがわかった。

通常、拡散係数を測定するためには、キャピラリー中をある時間をかけて動く距離を測るとか、NMRを利用して測定するなどの手法があったが、いずれも数時間から日のオーダーで測定時間が必要であり、時間分解観測には向かない。また、蛍光相関分光法でも拡散係数が高感度で求められるが、やはり速い時間分解は困難である。しかし、パルスレーザーを用いた過渡回折格子 (TG) 法とよばれる手法を用いると、ミリ秒で拡散係数の測定が可能となり、非常に多くのユニークな応用が可能となることを見いだしている。ここでは、この手法のタンパク質-タンパク質相互作用検出という観点からの研究を解説する。

2. 原理

この測定法の原理は、2本の光をある角度で交差させ、それらの間の干渉を利用することで光強度の空間的な変調を作り出し、タンパク質を空間的に異なった光強度で励起するところにある (Fig. 1)³⁾⁻⁵⁾。もし、この光励起タンパク質が化学反応を起こし、少しでも異なった構造をもつことになれば、光励起を起こしていないタンパク質とは光学的な性質が異なり、空間的な屈折率分布をもつことになる。この空間的に変調された屈折率分布は、回折格子の役目をし、別の光を別の方向に回折する。これがTG信号である。この信号強度 (I_{TG}) は、誘起された屈折率変化 (δn) の2乗に比例する。

$$I_{TG} = \alpha (\delta n)^2 \quad (1)$$

ここで α はある定数である。この信号強度は、空間的な濃度変調を反映するものであるため、タンパク質拡散によってこの濃度の空間分布変化が均一になる

Fig. 1
Principle of the transient grating method.

にしたがって、信号も弱くなる。よって信号の時間変化を測定することで、そのタンパク質の拡散係数を計測できることになる。拡散方程式を解くと、この時間変化は拡散係数 (D) と、グレーティング波数 (q) とよばれる干渉縞の間隔の逆数に比例した値の積 (Dq^2) を速度定数とする指数関数で減衰することが導かれる。たとえば、拡散係数 D_r をもつもとのタンパク質が、拡散係数 D_p の生成物に変化したとすると、信号はそれぞれの拡散係数に比例した速度定数の指数関数で変化するので、以下の式で表されることになる (t は時間)。

$$I_{TG} = \alpha \{ \delta n_p \exp(-D_p q^2 t) - \delta n_r \exp(-D_r q^2 t) \}^2 \quad (2)$$

このように、信号は、反応物と生成物の拡散係数の差に対応した時間変化を与えるので、拡散係数の変化を高感度・高時間分解能で検出できる。この手法での拡散検出に関する時間分解能は、作った回折格子の幅に依存する。この幅が狭いほど (つまり q が大きいほど) 速い時間で拡散による信号が観測され、速い時間分解が可能となる。われわれが通常用いている配置では $100 \mu s$ ぐらいの拡散係数変化を検出できる。これより速い時間スケールでの会合ではその速度を直接測定することはできないが、会合が起こっていることはその拡散係数変化から明らかにできる。

タンパク質自身が光吸収を起こして、何らかの変化をする場合には、それ自身の励起によって「回折格子」を作り出すことができ、信号が観測される。もし、調べたいタンパク質が光反応しない場合には、タ

ンパク質に特異的に結合して光反応を起こす小さな「色素」分子を溶液に混ぜておくことで、そうしたタンパク質の拡散が観測できる⁶⁾。

3. 利点

この手法でタンパク質の反応を調べるとき、多くの利点が考えられるが、たとえば表面プラズモン共鳴バイオセンサー法と比較した場合、次のような利点があげられる。まず、測定時間が非常に短くてすむ。これは、タンパク質を基板に結合するといった前処理が不要で、溶液中でそのまま測定できるためでもあるし、また拡散の計測時間が通常の条件ではミリ秒で終わるほど短いためでもある。表面プラズモン共鳴バイオセンサーでは不可欠の固定用チップが不要のため、カラムクロマトグラフィーと組み合わせることで、分離したタンパクをそのまま活性の測定に用いることができる。タンパク質-タンパク質結合があれば、もちろんその大きさが変わるので、拡散係数が変わり、検出される (Fig. 2a)。さらに、拡散係数はタンパク質の結合だけでなく、構造変化にも敏感であるため、ある小さい分子がタンパク構造変化を誘起するかどうか判定できる、すなわち、仮に小さい分子が大きなタンパク質に物理吸着しても拡散係数をほとんど変えないであろうが、もしタンパク質の構造を変えるような働きがあれば、拡散係数を変えるので、その変化を検出できる (Fig. 2b)。このようにタンパク質の構造を変えるかどうかの基準を通して、薬品の有効性を検出可能になると考えられる。また、疎水性のサンプルなどを使って実験を行う場合には、溶解するために有機溶媒も使用することが多いが、システムに有機溶媒に弱い部分はないため、大部分の有機溶媒を媒体として使用することができるし、溶媒交換も自由である。さらに、表面プラズモン共鳴測定を行うときに、測定温度一定でないとその安定性が保証されないことがあるが、拡散検出では、温度依存性は少ないので、高度な温度制御が不要である。また、当然その速い時間分解計測のため、安定性だけでなく結合の速度解析が可能となる。

4. 応用例

これらのユニークな特徴をもつ本手法を、われわれは多くのタンパク質反応へ適用しているが、ここでは光受容タンパク質反応への応用を2つあげるのに

Fig. 2

Schematic illustration of the principle of the diffusion detected bio-sensor for (a) protein-protein interaction of a transient species and (b) protein-drug interaction. Physical binding of a small molecule to a protein may not change the diffusion coefficient, but, when the conformation of the protein is changed, the diffusion coefficient changes.

と定める。受容タンパク質が光情報を伝えていくには、そのコンフォメーションを変えてタンパク間相互作用を変化させる過程が重要であるが、そうした場合にしばしばタンパク質の会合状態も変わる可能性がある。たとえば、光によって過渡的にダイマーが形成されたり、あるいは基底状態で会合しているような場合には過渡的解離が起こることもありうるであろう。しかし、こうした過渡的な会合状態の変化を実験的に明確に検出するのは、従来の手法ではかなり困難が伴うものである。たとえば基底状態での会合状態は、ゲルクロマトグラフィーなどにより検出できるであろうが、光を照射しながらゲルクロマトをしたとしても、定常的濃度が小さいと予想される活性状態の会合状態を検出するのは難しいかもしれない。この手法を用いると、過渡的会合・解離過程を明確に示すことができるのである。

4.1 PYP

photoactive yellow protein (PYP) とよばれる水溶性のタンパク質は、紅色細菌において光センサーの役目をしていてと考えられており、ロドプシンに代表されるレチナールタンパクの光受容性機構と関連して多くの興味もたれている。このタンパクの光反応のトリガーは、タンパクに結合している発色団である *p*-クマル酸のトランス-シス異性化による。これに引き続いて、大まかには pR, pB とよばれる中間体を経て、もとの基底状態へ戻ってくる光サイクル反応を示す⁷⁾。この光反応ダイナミクスは時間分解 X 線実験を

Fig. 3

Observed TG signals (circles) of PYP in (a) buffer solution, and in (b) buffer with an eluted fraction from the bacterium. The enhancement of the diffusion peak is due to the intermolecular interaction between the pB species and DNA of the bacterium.

はじめ、時間分解 IR, ラマンなど種々の分光法で研究されつつある。われわれは、この反応を時間分解エネルギー解析やタンパク部分の構造変化という、従来は時間分解で検出できなかった新しい観点から研究してきており、PYP 自体のダイナミクスはかなり明らかになってきた^{8),9)}。次の目標は、この構造変化がどのようにして信号となっているかを明らかにすることであろうが、どういうタンパク質と PYP が相互作用しているのか明らかではなかった。これの 1つの原因は、短時間しか存在しない反応中間体のタンパク-タンパク相互作用を検出することは従来の手法では困難であるためと思われる。この点、はじめに述べた時間分解相互作用検出法を用いると、こうした困難が克服できるであろう。新しい時間分解相互作用検出法の原理のデモンストレーションを兼ねて、PYP の反応中間体の分子間相互作用を過渡回折格子 (TG) 法を用いて検討した。

まず比較のために、PYP のみを含む溶液を光励起した後の広い時間領域での TG 信号を **Fig. 3a** に示す。信号は励起直後に速い速度で立ち上がり、この実験条件では数 μs の時間で減衰している。この減衰は、PYP から放出された熱エネルギーの拡散によるものである。それに引き続く 100 μs 領域の立ち上がりは、最初の pR 中間体から第 2 の pB 中間体へ変化するダイナミクスであり、最後にミリ秒より長い時間スケール

で、吸収などをモニターしていたのでは観測されない強い山型の信号が現れる。この最後の信号の速度は、過渡回折格子の縞パターンの距離を変えるとそれに応じて変化することから、分子拡散を表していることが直ちに結論できた。さらに、屈折率変化の符号から、立ち上がり速度が基底状態 PYP の拡散速度、減衰速度が pB の拡散速度を反映していると同定された。図からも明らかに減衰の速度のほうが立ち上がりの速度よりも遅いことがわかるが、このことは pB の拡散が pG よりも遅いことを示すものである。実際に、この山型信号部分は式 (2) で再現され、pB の拡散が pG よりも遅いため 2つの指数関数の差で表される山型信号が観測されていると説明できる。別な実験により、この pB の拡散係数が反応物 pG よりも遅いのは、pB 中間体における構造変化のためであることが明らかとなっている¹⁰⁾。

この溶液へ PYP を含む細菌 *E. halophila* の細胞破碎溶液を加えると、最後の山形信号の強度が非常な強くなる現象が観測された (**Fig. 3b**)²⁾。2つの指数関数の差で表される山型信号のピーク強度は、速度定数の差が大きくなると強くなるが、このことを考えると、溶液を加えることで拡散係数の差が大きくなったことがすぐにわかる。この信号を式 (2) でフィットすることにより、拡散係数の差の増大は、生成物の拡散係数が溶液を加えたことによって小さくなったためであることがわかった。すなわち、細胞内には明らかに PYP の反応中間体 pB と相互作用して拡散係数を小さくする分子種が存在することを示す。

細胞破碎溶液をクロマトグラフィーで分割して調べることにより、1つには、この細胞内に含まれていた DNA がこの PYP 中間体と相互作用していることが明らかとなった。さらに、この DNA を除いたタンパク質溶液をいくつかのフラクションに分別し、それぞれを PYP 溶液に加えていくと、あるフラクションだけが、この拡散係数変化を誘起することがわかった。すなわちこのフラクションに含まれるタンパク質が中間体と相互作用するターゲットということになる。この成分をさらに分割することで、このターゲットが明らかになっていくと思われる。

4.2 フォトリロビン

フォトリロビンは、植物体内で光屈性や葉緑体光定位運動などを制御する青色光受容タンパク質である。青色光で励起されると、LOV ドメインのポケットにある発色団フラビンモノヌクレオチドが LOV ドメインと共有結合し、その後再び解離して基底状態に戻る

という光反応サイクルがあることが過渡吸収などで知られている。しかし吸収変化は1 μs で終わり、発色団と LOV ドメインが共有結合してから解離する間に、どのような変化があるのかは、未知の部分が多い。われわれはフォトトロピン 1 (phot1) の LOV2 ドメインを用いて、その反応を時間分解で調べた¹¹⁾。

phot1-LOV2 ドメインサンプルの光励起後の TG 信号を Fig. 4 に示す。比較的早い時間スケールでは、発色団近傍の構造変化による減衰 (約 2 μs) と、励起分子から放出された熱が溶液中を拡散していくようすを表す信号が観測される。その後のミリ秒以降に現れる山型の信号は、先ほどの PYP と同様の実験により、タンパク質分子が溶液中を拡散していく過程を反映した信号であることがわかった。こうした山形信号が現れるのは、基底状態タンパク質の拡散係数とその時間における反応生成物の拡散係数が異なっていることによる。屈折率変化の符号を求めることにより、立ち上がりのほうが基底状態、減衰のほうが生成物の拡散を表すことが同定された。これは光励起によって何らかの「変化」が起こり、拡散係数を小さくしていることを示している。先ほどの PYP の例では、タンパク質構造変化によって拡散係数が変化したためであったが、この場合の変化とは何で、どういう速度でこの変化が起こっているのだろうか。

phot1-LOV2 の信号には、PYP には観測されない特徴的なようすが観測された。1 つには、グレーティング波数 q を変えて異なった時間スケールで信号を観測

すると、信号の形や強度が大きく変化したことである。もし 2 μs の速度で見られる吸収変化として観測された生成物の構造変化により拡散係数が変化したと考えると、 q を変えても、その形は式 (2) で表されるので、信号の現れる時間が変わるだけで、形は変わらないはずである。しかし、この場合には、信号の現れる時間スケールとともにそのピーク強度の変化が観測された (Fig. 5)。先ほどの PYP の場合の説明のように、このピーク強度は拡散係数変化の大きさに対応する。すなわち、ピーク強度が時間とともに増えることは、信号の観測されている時間スケールで生成物の拡散係数が徐々に小さくなっていることを示す。種々の時間におけるこの信号形を解析することで、拡散係数変化速度が求められることがわかった。

もう 1 つの特徴的なことは、この拡散係数変化速度に濃度依存性が見られたことである。異なった濃度での実験により、濃度が薄くなるほどこの速度が遅くなった。定量的な解析の結果、拡散係数変化の速度定数は濃度にほぼ比例することがわかった。このことは、光照射によって光励起されたタンパク質と基底状態のタンパク質の間でダイマー化が起こっていることを示している。すなわち、この場合には、基底状態の phot1-LOV2 自身が中間体と相互作用して、会合体を作ったために拡散係数が減少したことが明らかとなった。このタンパク質は光サイクル反応を起こし、数分後には基底状態に戻るが、このときにはもとのモノマーに戻っている。すなわち、観測されたダイマーは

Fig. 4

A TG signal (broken line) of phot1-LOV2 at 50 μM and $q^2=3.4\times 10^{10} \text{ m}^{-2}$. The best fitted curve to the observed TG signal based on the two state model is shown by the solid line, which is almost completely overlapped with the observed signal. From this fitting, D of the reactant and product, and the rate of the diffusion change were determined.

Fig. 5

TG signals (broken lines) of phot1-LOV2 solutions at q^2 -values of (a) 5.3×10^{12} , (b) 6.3×10^{11} , (c) 3.4×10^{11} , (d) 7.3×10^{10} , and (e) $4.5\times 10^{10} \text{ m}^{-2}$. The signals representing the molecular diffusion processes are shown and these signals are normalized at the initial part of the diffusion signal.

過渡的ダイマーである。このように、サブミリ秒で起こるタンパク質間相互作用が実時間で検出できたことになる。

このタンパク質の場合には、さらに興味深い現象が見られた。もし、このダイマー化速度よりも速い時間で信号を観測したらどうなるであろうか。当然、拡散係数変化は観測されないで、単一指数関数で変化するはずであり、実際にそうした信号が観測された。しかし、この速い時間スケールでも、さらにタンパク質濃度を高めると、先ほどと似た山型信号が現れ、しかも立ち上がりのほう（拡散速度の速いほう）が生成物、減衰のほう（拡散速度の遅いほう）が反応物の拡散を表すことが同定されたのである。これは、先ほどの拡散係数変化と逆であり、反応が起こると拡散係数が大きくなる（すなわち分子が小さくなる）ことを示す。拡散係数の値を求めたところ、反応物がダイマー、生成物がモノマーであることがわかった。よって、phot1-LOV2はこの高い濃度では基底状態でダイマーを形成し、光励起によってこのダイマーが過渡的に解離することが結論されたのである。

これは、拡散係数を用いることで、他の手法では検出困難な、過渡的な会合体形成（分子間相互作用の増大）や解離反応（分子間相互作用の減少）を時間分解で明らかにできることを示したはじめての報告である。もちろん拡散係数変化は、PYPのときに見られたようにタンパク質会合だけでなく構造変化によっても起こる可能性がある。このような場合には、広い時間範囲の拡散信号を2つの指数関数で解析し、濃度変化実験によって会合過程を区別する必要がある。また本方法では、光励起されたタンパク質のみの相互作用を抽出できるため、光照射しながらゲルクロマトグラフィーを行うという方法に比べて、感度よく、しかも間違い少なく検出が可能である。

5. まとめ

生体分子のバイオセンサーを考えたとき、その高感度性に注目されることが多いと思われるが、一方で時間分解能を向上させることで、また違った方面からの新しい生体分子研究が可能となる。この手法の特性を考えると、これまでには不可能であった新しいタンパク質活性計測が可能になるであろうこ

とが予想できる。現在、われわれは光受容タンパク質の信号伝達機構を探るため、この手法を用いて研究を進めているが、従来の手法ではわからなかった多くの構造変化に関する情報が得られている。今後、こうした新たな面から見直した反応スキームにより、より詳細なタンパク質の働きが明らかにされていくことを期待している。

謝 辞

この総説を書くにあたり、これらの研究の共同研究者にお世話になっております。特に、京都大学のKhan君、永徳君、中曽根君、奈良先端科学技術大学院大学の片岡教授、今元助教授（現・京都大学）、大阪大学の徳永教授、大阪府立大学の徳富教授に深く感謝いたします。

文 献

- Schultz, D. A. (2003) *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 13-22.
- Khan, J. S., Imamoto, Y., Yamazaki, Y., Kataoka, M., Tokunaga, F. and Terazima, M. (2005) *Anal. Chem.* **77**, 6625-6629.
- Eichler, H. J., Günter, P. and Paul, D. W. (1986) "Laser-induced Dynamic Gratings", Springer-Verlag, Berlin.
- Terazima, M. (2002) *J. Photochem. Photobiol. C* **24**, 1-28.
- Terazima, M. (2006) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 545-557.
- Baden, N. and Terazima, M. (2004) *Chem. Phys. Lett.* **393**, 539-545.
- Hellingwerf, K. J., Hendriks, J. and Gensch, T. (2003) *J. Phys. Chem. A* **107**, 1082.
- Takeshita, K., Hirota, N., Imamoto, Y., Kataoka, M., Tokunaga, F. and Terazima, M. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8524-8528.
- Takeshita, K., Imamoto, Y., Kataoka, M., Mihara, K., Tokunaga, F. and Terazima, M. (2002) *Biophys. J.* **83**, 1567-1577.
- Khan, J. S., Imamoto, Y., Harigai, M., Kataoka, M. and Terazima, M. (2006) *Biophys. J.* **90**, 3686-3693.
- Eitoku, T., Nakasone, Y., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Terazima, M. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13238-13244.
- Nakasone, Y., Eitoku, T., Matsuoka, D., Tokutomi, S. and Terazima, M. (2006) *Biophys. J.* **91**, 645-653.

寺嶋正秀

寺嶋正秀（てらじま まさひで）

京都大学大学院理学研究科教授

1982年京都大学理学部卒、86年京都大学大学院理学研究科化学専攻博士後期課程中退。理学博士。同年東北大学理学部助手。90年京都大学理学部講師。93年京都大学理学部助教授。01年より現職。

研究内容：タンパク質反応の分子科学

連絡先：〒606-8502 京都府京都市左京区北白川

E-mail: mterazima@kuchem.kyoto-u.ac.jp