総説

ピコ秒領域における蛋白質のゆらぎ

三重県立看護短期大学 田中文夫
新技術事業団増原極微変換プロジェクト 玉井尚登

A time-resolved fluorescence spectroscopy of tryptophan has been applied to reveal the fluctuation of a protein structure. The experimental results have been compared with a molecular dynamics simulation. Protein dynamics in the picosecond time region associated with the change of electronic state have been presented for a flavoprotein and phytochromes.

Fluctuation/picosecond/time-resolved fluorescence/protein/structure

1. はじめに

1970年代以降、蛋白質はさまざまな時間領域で分子内運動をしていることが明らかにされ、蛋白質の機能も動的な観点から見なおされるようになってきた^{1),2)}。分子動力学(分子運動学)の方法による理論計算によると、低分子と同じくサブピコ秒で原子の振動がおこる。さらに蛋白質ではピコ秒領域で低分子にはない集団運動がおこる。この集団運動は蛋白質のある領域全体の振動運動に相当し、蛋白質のゆらぎともよばれる(表1)。蛋白質のゆらぎは原子間相互作用の非線形性、すなわち調和振動子からのずれによって生じるのである³⁾。

ピコ秒領域の蛋白質のゆらぎを観測する方法としては、NMR、誘電緩和、超高速時間分解分光法などがあるが、ここでは主として超高速時間分解蛍光法によって得られた蛋白質のゆらぎ現象についてのべる。

2. 蛋白質のピコ秒ゆらぎと時間分解蛍光

現在多くの蛋白質でトリプトファン残基を1つしかもたないにもかかわらず、その蛍光強度が非指数関数的に減衰することがわかっている。また蛋白質内部に埋まっているトリプトファン残基が分子内運動の自由度をもっている^{4),5)}。トリプトファン残基が非指数関数的に減衰する理由は、トリプトファンの蛍光がその近傍にある $-NH_3^+$ 、 $C=O$ 、 $S-S$ などによって消光されるので、蛋白質内部のゆらぎによってトリプト

ファン残基の消光定数がこれら消光剤との相対距離や配向によって時間とともに変化するためであると考えられている^{6),7)}。トリプトファンの時間分解蛍光から蛋白質のゆらぎについて定量的な知見を得るためには、蛍光消光定数の解析的な表式が必要である。

蛍光の消光が励起エネルギー移動による場合、その速度定数がわかっているので励起エネルギー供与体の時間分解蛍光の解析から、蛋白質に結合した発色団の分子内運動について定量的な知見を得ることが可能である。

Förster によるとエネルギー移動確率は

$$k_t(t) = c [\kappa(t)/R^3(t)]^2 \quad (1)$$

で与えられている。ここで $R(t)$ は励起エネルギー供与体と受容体間の距離であり、 c は定数である。 $\kappa(t)$ は配向因子とよばれエネルギー供与体と受容体の相対配向によってきまる。

Hochstrasser らはいくつかのミオグロビン(Mb)の蛍光強度と偏光異方性の減衰を測定してトリプトファン残基からヘムへの励起エネルギー移動について研究し⁸⁾(表2)、以下の方法で蛋白質のゆらぎについて解析しているので紹介する。彼らは蛍光強度と偏光異方性の減衰をそれぞれ(2)と(3)によって分子動力学の方法で計算し、これらの実験結果を説明することを試みた⁹⁾。

$$F(t) = \langle \exp \{ - \int_0^t [k_0 + k_t(\tau)] d\tau \} \rangle \quad (2)$$

$$r(t) = 0.4 \langle \exp \{ - \int_0^t [k_0 + k_t(\tau)] d\tau \} \cdot P_2 \{ \mu_T(t) \cdot \mu_{Te}(0) \} \rangle / F(t) \quad (3)$$

(2)で k_0 は励起エネルギー移動のないときの蛍光寿命の逆数である。また、(3)の $P_2(x)$ は2次のルジャンドルの多項式である。 μ_T と μ_{Te} はトリプトファ

Protein Fluctuation in the Picosecond Time Region

Fumio TANAKA, Mie Nursing College

Naoto TAMAI, Microphotoconversion Project, ERATO

表 1. いろいろな現象の時間領域

時間領域(s)	蛋白質の現象	一般分子の現象
10^{-15}		<ul style="list-style-type: none"> 分子内電子の運動 電子励起の速度
10^{-13}	<ul style="list-style-type: none"> 蛋白質内原子の調和振動 CO・ヘモグロビンの光解離 O₂・ヘモグロビンの光解離 	<ul style="list-style-type: none"> 電子エネルギーの振動緩和 原子の振動
10^{-12}	<ul style="list-style-type: none"> バクトリオロドプシンの光合成中心における光誘起電子移動 光合成中心の光誘起電子移動 レチナールにおけるプロトン移動 レチナールのシストランス変換 トリプトファンの励起電子エネルギー緩和 アミノ酸側鎖メチル基の回転運動 	<ul style="list-style-type: none"> プロトン移動 分子の回転運動
10^{-11}	<ul style="list-style-type: none"> 蛋白質内の小規模のゆらぎ D-アミノ酸オキシダーゼフラビンの電子状態変化 フラビン酵素の光誘起電子移動 大規模な蛋白質のゆらぎ 	
10^{-10}	<ul style="list-style-type: none"> トリプトファン残基の分子内運動 フィトクローム発色団の分子内運動 	
10^{-9}	<ul style="list-style-type: none"> DNA のねじれ運動 	<ul style="list-style-type: none"> 蛍光寿命
10^{-8}	<ul style="list-style-type: none"> CO・ヘモグロビンの CO 解離にともなうヘム近傍における構造変化 	<ul style="list-style-type: none"> 三重項状態への移行
10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> CO・ヘモグロビンの CO 解離によって誘起されるアロステリック転移のサブユニット間相互作用 	

表 2. ミオグロビンの蛍光強度と偏光異方性の減衰パラメーター^{8),9)}

Mb	実測・計算	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ns)	$\phi_1^{a)}$ (ns)	備 考
Mb(マッコウクジラ)	実測	14	106	2.68	nd ^{b)}	Trp-14 と Trp-7 をもつ
metMb(マッコウクジラ)	実測	16	135	2.22	0.83	
metMb(マッコウクジラ)	計算(MD)	110	210	nc ^{c)}	ca.1.4	MD: 分子動力学法
	計算(結晶)	31	125	np ^{d)}		X 線回折による結晶構造の座標により計算 τ_1 と τ_2 は Trp-14 と Trp-7 の蛍光寿命に対応
metMb(マグロ)	実測	31	132	2.17	0.11	Trp-14 だけをもつ
	計算(MD)	50	130	nc ^{c)}	ne ^{e)}	metMb(マッコウクジラ)の計算結果の Trp-14 成分

a) トリプトファン残基の分子内運動の回転相関時間; b) 実験で検出されなかった; c) 計算精度の範囲外; d) 存在しない; e) 分子動力学の方法では説明不可能

ンの吸収遷移モーメントと蛍光遷移モーメントの単位ベクトルである。分子動力学の方法では各原子の座標の時間依存性が求まるので、ある時間点を $\tau = 0$ にえらび以降の原子座標で $k(\tau)$ および $d\tau$ についての積分値を計算する。 $\langle \dots \rangle$ は $\tau = 0$ の時間点をいろいろな時間点にずらしたときの平均値である。

図 1a は分子動力学の計算によってえられた、マッ

コウクジラ Mb の 2 つのトリプトファン残基、Trp-7 と Trp-14 の C _{α} -C _{β} 結合軸のまわりの回転角のトラジェクトリーである。いずれも回転角に大きな不連続の変化がみられる。これらの変化は C _{β} -C _{γ} のまわりの回転角の不連続な変化と連動しておこる。図 1b と図 1c は式(2)と(3)で計算された蛍光強度と偏光異方性の減衰である。表 2 に計算結果を記した。計算結果と

図1. 分子動力学で得られたミオグロビンのゆらぎとトリプトファン残基の時間分解蛍光^{8),9)}.

- マッコウクジラミオグロビンのトリプトファン残基のゆらぎ：分子動力学の方法によるC_α-C_βの回転角のゆらぎ
- 計算で得られたトリプトファン残基の蛍光強度の減衰
- 計算により得られたトリプトファン残基の偏光異方性の減衰：右は左図の時間軸の拡大図である。右図の速い減衰は力学過程で、左図の遅い減衰が拡散過程である。数100ps 分子内運動は拡散過程で決まる。

トリプトファン

実測値は比較的良好であるが、まだまだ改良の余地があるといえよう。アズリン¹⁰⁾やリボヌクレアーゼ TI¹¹⁾についても時間分解蛍光の実験結果を分子動力学法による計算によって説明する試みがなされている。

3. 電子状態の変化と蛋白質構造のダイナミクス

光励起によって電子状態が変わると、蛋白質に結合している発色団では次のような変化がおこる。

- 分子構造のシストランス変化：視覚物質、フィトクローム、光受容体など
- pK_aの変化により水素結合がきれたり、新しく形成されたり、またプロトン移動がおこる：フラビンなど
- 分子の双極子モーメントが変化して溶媒緩和がおこる：トリプトファン残基、蛍光標識色素など
- リガンドの結合がされる：CO・ヘム
- 酸化還元電位の変化による電子移動：光合成、光受容体など

これらの変化にともなって発色団とその周辺のアミノ酸残基との相互作用が変化する。この変化はやがて蛋白質のさまざまな時間領域のゆらぎによって蛋白質全体にゆきわたる。電子状態の変化は数フェムト秒でおこる。したがって、これらの発色団の光励起により蛋白質は原理的にはこの時間領域のパルスによって刺激されたのち、平衡構造が別の平衡構造へ変化する。CO・ヘモグロビンではこの変化はアロステリック転移である。表1には蛋白質における光励起応答の最近の成果を挙げた。ここでは最近われわれが得たいくつかの系の、光励起にともなう蛋白質構造のピコ秒応答について紹介する。

D-アミノ酸オキシダーゼは哺乳類のいろいろな臓器に分布する酵素で、D-アミノ酸をアンモニアとピルビン酸に分解する。この酵素は単量体（分子量4万）あたりFADを1モル結合している。FADの蛍光スペクトルは図2に示したように励起直後では584nmに極大をもつが100ps以内に65nm短波長側にシフトする¹²⁾。遊離FADではこのような現象は起こらない。

図2はFADの電子状態が光励起によりフェムト秒で変化したのち、FADとアミノ酸との相互作用（おそらく水素結合）が修正をうける過程を表している。またFADの蛍光消光定数から酵素の温度転移が見出された¹³⁾。

太陽光線は光合成に使われるだけでなく、植物の発生、成長、老化などのコントロールにもつかわれている。このような一連の生体反応は光形態形成とよばれ、フィトクロームとよばれる光受容体が光吸収することにより開始される。フィトクロームはフィトクロモビルンとよばれる色素をもち、660nm付近に吸収極大をもつPrと730nm付近に吸収極大をもつPfrの2つの形がある。これらはそれぞれを光照射することにより相互変換する¹⁴⁾。

最近 Song らは時間分解蛍光法によりオート麦とえんどう豆からとったフィトクロームを用いてPrの光受容過程について研究している¹⁵⁾。これによると、蛍光の主成分は30-50psで減衰し、さらに1ns程度の長寿命成分が数%存在することがわかった。これらの減衰パラメーターはグリセリンやショ糖の添加により変化した、高分子のFicollでは変化しなかった。したがって、Prは疎水的なポケットにはいており、グリセリンやショ糖分子ではこの発色団と接触できるがFicollはこのポケットに入れないものとおもわれる。Prの減衰パラメーターが溶媒の粘度依存性をもつことは、Prが励起寿命の間に分子内運動することを示唆している。実際Prの時間分解偏光異方性は200ps

図2. D-アミノ酸オキシダーゼのFADの時間分解蛍光スペクトル¹²⁾。

図中の数字は励起時点からの時間を表す。温度20°C

図3. フィトクロームPrの蛍光偏光異方性減衰¹⁵⁾。

図中の波長はモニターした蛍光の波長を示す。フィトクロモビルンが約200psで分子内運動をしている。

で減衰した（図3）。これらの結果はPrの光受容の初期過程に受容体の分子内運動が重要な役割を果たしていることを示している。

4. おわりに

蛋白質に結合した生体分子の蛍光はほとんどがピコ秒領域で減衰するので、ピコ秒時間分解蛍光法はこの時間領域で起こると考えられている蛋白質のゆらぎについて実験的な知見を得るのに適している。これらの実験結果から蛋白質のゆらぎについてより詳細な知見を得るためには、定量的に解析できるモデルや理論を確立する必要がある。分子動力学の方法はその有力な方法の1つといえるだろう。

文 献

- 1) Karplus, M., McCammon, J. A. (1983) *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 263-300.
- 2) 大沢文夫 (1985) 蛋白質核酸酵素別冊「時間領域から見た生命現象」(木原, 小林, 木下, 永山, 広海編), No. 28, 2-13, 共立出版, 東京
- 3) 郷 信広 (1985) 蛋白質核酸酵素別冊「時間領域から見た生命現象」(木原, 小林, 木下, 永山, 広海編), No. 28, 14-25, 共立出版, 東京
- 4) 田中文夫, 又賀昇 蛋白質核酸酵素 (印刷中)
- 5) Tanaka, F., Mataga, N. (1987) *Biophys. J.*, **51**, 487-495.
- 6) Tanaka, F., Kaneda, N., Mataga, N., Tami, N., Yamazaki, I., Hayashi, K. (1987) *J. Phys. Chem.*, **91**, 6344-6346.
- 7) Tanaka, F., Mataga, N. (1982) *Biophys. J.*, **39**, 129-140.
- 8) Hochstrasser, R.M., Negus, D.K. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4399-4403.
- 9) Henry, E.R., Hochstrasser, R.M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6142-6146.
- 10) Lin, X.-Q., Engh, R.A., Brünger, A.T., Nguyen, D.T., Karplus, M., Fleming, G.R. (1988) *Biochemistry*, **27**, 6908-6921.
- 11) Axelsen, P.H., Prendergast, F.G. (1989) *Biophys. J.*, **56**, 43-66.
- 12) Tanaka, F., Tamai, N., Yamazaki, I. (1989) *Biochemistry*, **28**, 4259-4262.
- 13) Tanaka, F., Tamai, N., Yamazaki, I., Nakashima, N., Yoshihara, K. (1989) *Biophys. J.*, **56**, 901-909.
- 14) Song, P.-S., Yamazaki, I. (1987) *Phytochrome and Photo-regulation in Plants* (Furuya, M., ed.) 139-156, Academic Press, Tokyo.
- 15) Song, P.-S., Singh, B.R., Tamai, N., Yamazaki, T., Yamazaki, I., Tokutomi, S., Furuya, M. (1989) *Biochemistry*, **28**, 3265-3271.

たなか ふみお

三重県立看護短期大学教授

1969年大阪大学基礎工学研究科博士課程修了。工博。

1970-1973年アリゾナ大, イリノイ大で Research Associate として生物物理学を学ぶ。1974年名古屋大学医学部生化学科で助手として生化学を学ぶ。1977年より現職。時間分解蛍光法による蛋白質構造の研究に興味をもっている。生物物理の学際的な領域に惹かれている。

連絡先 津市鳥居町100

三重県立看護短期大学

☎0592-28-3171

たまい なおと

新技術事業団・増原極微変換プロジェクト研究員

1982年大阪大学基礎工学研究科修士課程修了。同博士課程在学中に分子科学研究所助手となる。工博。1988年北海道大学助手を経て現職に就く。生体系の研究は今後ますます共同研究が重要になってくると思う。

連絡先 京都市下京区中堂寺南町17リ京都リサーチパーク内

新技術事業団・増原プロジェクト

☎075-312-0070