実験技術

フローフラッシュ・ラピッドスキャン法 によるヘムタンパク高速反応の追跡

京都大学大学院 医学研究科 公衆衛生 折井 豊

1. フローフラッシュ・ラピッドスキャン法で何を測定するのか

1963年にGibsonとGreenwoodは、チトクロム酸化酵素と酸素との反応の、特に初期過程を追跡する手段としてフローフラッシュフォトリシス法を開発した¹⁾。還元型酵素と酸素をストップドフロー装置で混合すると、反応のほとんどは装置の不感時間内(2~3ミリ秒)に終了してその反応過程を追跡することができない。フローフラッシュ法ではチトクロム酸化酵素の還元型を一酸化炭素と反応させて安定な複合体を作り、この複合体を酸素を含んだ反応液とストップドフロー装置で混合して観測用セルに送り、側面から閃光照射して反応を開始させる。チトクロム酸化酵素・一酸化炭素の複合体は光解離の収率が1と極めて高く、パルス幅が5ナノ秒のレーザーで照射する間に還元型酵素がほぼ100%遊離し、直ちに酸素との反応が始まる。Gibsonらは吸光度の時間変化を観測波長を変えて測定をくり返し、そのトレースを時間分割して時間差スペクトルを描くことにより、反応に関与するスペクトル成分を推定した。

反応を追う際に、スペクトルの時間変化を直接に記録できれば、情報量は一躍増大し、反応中間体の同定も容易になる。そこで筆者が導入したのがフロー・ダブルフラッシュ法である^{2), 3)}。閃光分解用レーザーフラッシュの一部を検出器で受けて遅延回路を作動させ、一定の遅延時間後モニター用のキセノンフラッシュ(閃光時間は1マイクロ秒)を照射してスペクトルを検出器(MOS型のイメージセンサー、512チャンネル/208nm)に記憶させる。反応溶液を通過した光と、レファランス光の同時測定が可能なダブルビームイメ

センサーを用いて、測定毎のキセノンフラッシュ強度の変動を補正すると、1回の測定でS/N比のよいスペクトルを1マイクロ秒からミリ秒までの時間領域で記録することができる。一方、1ミリ秒以降のスペクトル変化は、キセノンランプ(連続光)をモニター光として512本のスペクトルの連続ラピッドスキャン法で記録する。200nm幅のスペクトルの取込時間は最小で1ミリ秒であるが、この取込時間とその時間間隔を変化させることで、1ミリ秒から時間以上の連続記録が可能となる。また対数時間軸に沿ってのデータ取り込みも可能である。スペクトルデータはバイナリー形式でいったん保存してから、目的に応じて各自の好みのプログラムで加工処理する。

これらの装置は(株)ユニソク(枚方市)と共同で開発したもので、その経緯については文献4を参照していただきたい。なお装置は現在市販されている。

2. 大腸菌ユビキノール酸化酵素を用いた測定例

大腸菌ユビキノール酸化酵素は1分子内にヘムBと

図1 大腸菌ユビキノール酸化酵素と酸素との反応によるスペクトル変化。上は塩素イオン型で下は脱塩素イオン型。詳細については文献8を参照。

Rapid reactions of hemeproteins as revealed by the flow-flash, rapid-scan method

Yutaka ORII

Department of Public Health, Graduate School of Medicine, Kyoto University

ヘムOをそれぞれ1分子、銅を1原子持ち、それにユビキノール1分子が結合している⁹⁾。ユビキノール2分子から供給される4電子で分子状酸素が水に還元される間に、この酵素がポンプとして働き、プロトンを細胞の外に運び出す^{6), 7)}。完全還元型酵素と酸素が反応すると、1ミリ秒まではスペクトルが単調に変化してピークが短波長側に移る(図1, 上)⁸⁾。その間、ヘムOと銅で構成される酸素還元部位で、酸素結合型の生成を示唆するようなスペクトル変化は確認されていない。これは電子受容部位から酸素還元部位への分子内電子移動が極めて速く、反応中間体が蓄積する余裕がないため、と考えられる。さらに1ミリ秒間のスペクトル変化の様子が反応条件により顕著に異なることがわかった。図1, 下は同じ反応を、酵素標品および反応溶液から塩素イオンを取り除いた場合の結果で、1ミリ秒後のスペクトルは山の頂上が押しつぶされている。塩素イオンを除くと分子内電子移動が律速になり、ヘムBが還元状態に留まっている一方、ヘムOはすでに酸化されたのであろう。この酵素は完全還元型でもヘム、銅の金属イオンは3電子しか保持せず、4番目の電子は結合ユビキノールからくるものと考えられている⁹⁾。したがってヘムBの酸化が抑えられても、残りの2電子が結合ユビキノールから通常の経路とは異なる道筋で供給されるのかも知れない。酵素活性を通常の方法であるユビキノールの酸化速度で求めると、両者には差がなく区別がつかないので、恐らく分子内電子移動のひとつの経路が遮断されると、それに代わる別の経路が働くようになったからで、生体に備わったある種のフェイルセーフの機構の発現と考えられる。

この酵素のCu_Bへの配位子であるHis333を遺伝子工学的手法でAlaに置換すると、Cu_Bの欠落し、ユビキノール酸化酵素活性が野性型の千分の一程度に低下した標品が得られる。フローフラッシュ法で酸素との反応を解析すると、酸素との反応速度のみならず、分子内電子移動速度も大幅に低下することが明らかになった。その結果、反応の過程で酸素複合体と一酸化炭素複合体が共存するようになり、ミオグロビン様の性質を示すことが明らかになった。このことからCu_Bが酸素分子を手際よく捕捉し、それに効率よく電子を供給するための場作りに、極めて重要な役割を果たしていることが浮かび上がった¹⁰⁾。

3. データの解析法的重要性

時間分解法で記録した一連のスペクトル変化は、記録に要した時間領域とスペクトルの時間間隔が適当であると、反応過程についての豊富な情報を含んでいる。

スペクトル変化の様子は三次元表示^{11), 12)}や等高線表示¹³⁾を用いると、その全貌を見渡すことができる。これらは反応の内容を定性的に理解する上では大いに役立つが、さらに反応の本質の理解に必要な情報を、定量的な解析を通じて可能な限り引き出す必要がある。パーソナルコンピュータの性能の向上に伴い、大きな行

図2 スペクトル変化のマトリックスによる表現と、それがスペクトル成分と時間成分からどのように構成されるのかを图示。

列の演算が比較的容易になり、以下に述べるような解析が可能になった。

一連のスペクトルが反応に関与するすべてのスペクトル種の時間変化の総和であるとすれば、それは各々のスペクトル成分とその時間変化に分解されるはずである。このことを図2に即して説明しよう。反応はI→II→IIIと進み、それぞれが独自のスペクトルをもつものとする。Dはこの例では245×3の大きさの配列を表わし、1行目にIのスペクトル、3行目にIIIのスペクトル、あいだの2行目には中間体IIのスペクトルがそれぞれ規準化されて納められている。一方配列Fの第1行にはスペクトル成分Iの、第2行には成分IIの、第3行には成分IIIの時間変化が0から1の間の数値として納められている。この例ではサンプリング時間が42点であるので、Fの大きさは42×3となる。したがって、あるサンプリング点で記録されるスペクトルは、3本のスペクトルをその時点の成分比で合算して得られ、これを各サンプリング点で繰り返すと、配列Aで表わされる一群のスペクトルが得られる。行列の演算では、AはDとFの転置行列、の積として表わされる¹⁴⁾。

$$A = DF^T \quad (1)$$

したがってあらかじめDが分かっている場合には、反応モデルと各反応段階の速度定数を仮定することでFを、そしてAを計算で求めることができる。これをA*で表現する。一方、Dが未知であれば推定した反応モデルから配列Fを作り、行列の演算で観測されたスペクトル配列AとFからDを求め、そのDとFから(1)に従いを計算で求める。いずれの場合でも

$$\sum_{\lambda} \sum_{\text{time}} \|A - A^*\|^2 \quad (2)$$

が最小になるように最適化を行い速度定数を導き、F、Dを順次計算で得る。チトクロム酸化酵素の還元過程の解析にこの方法を適用してIIの反応に関与する成分の時間変化とスペクトルが導かれ、観測されたスペクトル変化が完全に再現されるにいった¹⁵⁾。

4. 展望

酵素分子の反応中の振舞いを観測するには、1マイクロ秒の時間分解能があれば十分である。その反応がスペクトル変化を伴うものであれば、ここで述べた手法でその全貌を捉えることができる。さらに想定した反応モデルに基づき素過程の微視的速度定数とそれに関与する反応中間体のスペクトルが求められるほど、解析法も進歩してきた。反応モデルと、微視的速度

定数、そして反応中間体のスペクトルから反応過程のスペクトル変化を再構成し、それが実測データと一致することを目安として解析を行うのであるから、モデルの任意性はかなりの程度抑えられる。例えば、ある魅力的な反応モデルを考えても、導かれた反応中間体の絶対スペクトルに負の部分があると、このモデルは放棄せざるをえなくなる。すなわち反応モデルを想定することからして研究者の経験、直感、創造力など、知恵のすべてが動員されなければならない。そしてモデルが導き出され、反応の分子設計図として目の前に置かれると、さらに想像力が掻きたてられることになる。この分野の真の発展はこれからである。

反応過程にある酵素分子に、試薬から光励起により遊離する電子、プロトン、カルシウムなどを第二の摂動として作用させ、その応答を解析することにより、動的状態の構造や反応性を明らかにしてゆくなど、フローフラッシュ法の適用範囲もこれから拡大することが期待される。

文 献

- 1) Gibson, Q. H. and Greenwood, C. (1963) *J. Biol. Chem.* **86**, 541-554.
- 2) Orii, Y. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7187-7190.
- 3) Orii, Y. (1993) *Biochemistry* **32**, 11910-11914.
- 4) 折井 豊 (1992) 新生物化学実験法講座 5 生体酸化・薬物代謝 (日本生化学会編) 119-127, 東京化学同人.
- 5) Sato-Watanabe, M., Mogi, T., Miyoshi, H., Iwamura, H., Matsushita, K., Adachi, O. and Anraku, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28899-28907.
- 6) 茂木立志 (1995) 生化学 **67**, 93-107.
- 7) Mogi, T., Nakamura, H. and Anraku, Y. (1994) *J. Biochem.* **116**, 471-477.
- 8) Orii, Y., Mogi, T., Sato-Watanabe, M., Hirano, T. and Anraku, Y. (1995) *Biochemistry* **34**, 1127-1132.
- 9) Orii, Y., Mogi, T., Kawasaki, M. and Anraku, Y. (1994) *FEBS Lett.* **352**, 151-154.
- 10) Mogi, T., Hirano, T., Nakamura, H., Anraku and Y., Orii, Y. (1995) *FEBS Lett.* **370**, 259-263.
- 11) Orii, Y. and Anni, H. (1990) *FEBS Lett.* **267**, 117-120.
- 12) Orii, Y., Yumoto, I., Fukumori, Y. and Yamanaka, T. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14310-14316.
- 13) 折井 豊 (1994) 蛋白質核酸酵素 **39**, 1152-1160.
- 14) Hendler, R. W. and Shrager, R. I. (1994) *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 1-33.
- 15) 折井 豊 (1995) 細胞エネルギー共役系の構築と調節, 平成7年度研究成果報告書.