

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006 ~ 2009

課題番号：18205002

研究課題名 (和文) 時間分解熱力学の創生と蛋白質反応機構の解明への適用

研究課題名 (英文) Development of time-resolved thermodynamics and application to revealing protein reaction mechanism

研究代表者

寺嶋 正秀 (TERAZIMA MASAHIDE)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00188674

研究分野：物理化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：熱力学・時間分解・タンパク質・反応ダイナミクス・過渡回折格子・反応中間体

## 1. 研究計画の概要

熱力学は科学の発展に非常に貢献してきたが、時間という概念が欠けていた。もし短時間にしか存在しない過渡的分子に対しても、その熱力学的性質を明らかにすることができれば、科学全体に対するブレークスルーになるであろう。ダイナミクスと熱力学から得られる情報を統合することによって、化学反応の理解はより深まるはずである。時間分解熱力学量測定法の完全創生とこの手法を用いたタンパク質反応機構の解明を目的とした新しい検出手法の開発を行い、タンパク質反応への適用を行う。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 熱力学と速度論という2つの大きな分野を融合した、時間分解熱力学手法を、Photoactive Yellow Protein (PYP) と呼ばれる光感受性蛋白質に適用し、歴史上はじめて反応中間体の熱容量変化を時間分解計測することに成功した。その結果、3ns で生成する pR 状態ではほとんど熱容量は変化してないが、200 マイクロ秒で生成する pB 状態では、その生成に伴って熱容量の増加が観測された。これは、疎水残基の水和したためと結論し、経験式に基づいて何残基ぐらいが水和しているかを明らかにした。

(2) PYP について反応中間体の拡散係数(D)測定を行い、この部分の構造変化の寄与をDの変化として捕らえることに成功した。それぞれの状態でのD値を求めることができ、N末端の欠如により、どれだけ摩擦係数変化が起こるかを計算することができた。これが他のヘリックス蛋白にも使えるならば、

Dの変化からどれぐらいのヘリックスの壊れが起こっているかを計算することができるとの手法を提出したという大きな意義を持つ。

(3) 植物の青色光センサー蛋白質であるフォトロピンのLOV2ドメインを用いて、基底状態と生成物の拡散を決定することができた。この拡散係数の変化を調べた結果、光照射によって光励起された蛋白質と基底状態の蛋白質の間でダイマー化が起こっていることを示すことに成功した。

(4) 古細菌の光受容タンパク質であるSensory rhodopsin II (SRII)のAsp75を置換した、D75N変異体について研究を行った。従来は必須と思われていたM中間体が欠損した変異体でも生理活性は保たれていること、光情報伝達で重要な役目を果たすトランスデューサーの細胞質側に伸びた部分の構造変化が構造変化していることを時間分解で示すことができた。またトランスデューサーの構造変化は、吸収で見るフォトサイクルが元に戻ってもしばらく残っていることを明らかとした。

(5) アポブラストシアニンと言うタンパク質の折り畳み過程における熱力学量を、時間分解で測定した。その結果、折り畳みにしたがって、これまでになく大きなエンタルピー不安定化が起こっていることが明らかとなった。これは、化学反応によってギブズエネルギーが減少すべきであるという原理に基づく、折り畳みによってエントロピーが大きく増大している事を示し、従来の概念では説明できない事が分かった。さらに、その理論的な解析を行い、水分子が排除されるためのエントロピーによる効果で折りたたみが

進行していることを明らかとした。

(6) 植物の持つ青色光センサーであるフォトトロピン Phot1LOV2 ドメイン単体(LOV2 試料)とそれに linker を付随させたもの(LOV2-linker 試料)を用いて、その反応を研究した。得られた拡散信号の形や強度に観測時間依存性が見出され、光照射により誘起された拡散係数変化を伴う蛋白質全体の構造変化が観測されていると結論した。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(理由)

時間分解熱力学法は当初考えていたよりも、広範にさらに敏感にタンパク質反応ダイナミクスを検出可能であることが分かってきた。この適用性の広さにより、これまで知られていなかった種々のタンパク質反応の機構が明らかにされ、当初の計画以上の対象に拡大されているため。

### 4. 今後の研究の推進方策

すでに多くの成果をあげてきているので、この方向性を保ちたい。また、残された熱力学量の時間分解検出にも取り組む。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 50 件)

S.Hirota, Y.Fujimoto, J.Choi, N.Baden, N.Katagiri, M.Akiyama, R.Hulsker, M.Ubbink, T.Okajima, T.Takabe, N.Funasaki, Y. Watanabe, M.Terazima, Conformational Changes during Apoplastocyanin Folding Observed by Photocleavable Modification and Transient Grating, *J.Am.Chem.Soc.*, **128**, 7551-7558(2006).

T.Eitoku, X.Zarate, G.V. Kozhukh, J.-I.Kim, P.-S. Song, M.Terazima, Time-resolved detection of conformational changes in Oat Phytochrome A: Time-dependent diffusion, *Biophys.J.*, **91**,3797-3804(2006).

N. Baden, S. Hirota, T. Takabe, N. Funasaki, M. Terazima, Thermodynamical properties of reaction intermediates during apoplastocyanin folding in time-domain, *J.Chem.Phys.*, 127,

175103 (1-12) (2007).

Y.Nakasone, T.Ono, A.Ishii, S.Masuda, M.Terazima, Transient dimerization and conformational change of a BLUF protein: YcgF, *J.Am.Chem.Soc.*, **129**, 7028-7035(2007).

P. Hazra, K.Inoue, W. Laan, K. J. Hellingwerf, M. Terazima, Energetics and role of hydrophobic interaction during photoreaction of BLUF domain of AppA, *J.Phys.Chem.B*, 112, 1494-1501(2008).

K. Inoue, J. Sasaki, J. L. Spudich, M.Terazima, Signal transmission through the HtrII transducer alters the interaction of two  $\alpha$ -helices in the HAMP domain,*J.Mol.Biol.*, 376, 963-970(2008).

〔学会発表〕(計 195 件)

吉留崇、木下正弘、廣田俊、馬殿直樹、寺嶋正秀、アポプラストシアニン折りたたみの熱力学理論と実験との定量的比較、第 31 回溶液化学シンポジウム、2008 年 11 月 11 日 13 日

〔図書〕(計 6 件)

M. Terazima, Time-resolved detection of intermolecular interaction of photosensor proteins, *Water and Biomolecules, Physical Chemistry of Life Phenomena*, Eds. K.Kuwajima, Y.Goto, F.Hirata, M.kataoka, M.Terazima, Springer, (149- 172), 2009.

〔その他〕

ホームページ:

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/index.html>