解説

圧力印加過渡回折格子法による反応中の タンパク質圧縮率の時間分解計測

黒井 邦巧^{a,b}, 寺嶋 正秀^b

^a分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域 ^b京都大学大学院理学研究科 化学専攻

(受取日:2015年12月1日,受理日:2016年1月11日)

Time-Resolved Measurement of the Compressibility of a Protein during a Reaction by the Pressure Variable Transient Grating Technique

Kunisato Kuroi^{a,b} and Masahide Terazima^b

^a Institute for Molecular Science ^b Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

(Received Dec. 1, 2015; Accepted Jan. 11, 2016)

Thermodynamic parameters are fundamental quantities to characterize chemical reactions. For a long time, these parameters have been measured only under equilibrium conditions. However, our group has developed a novel time-resolved detection method of the thermodynamic parameters using the pulsed laser induced transient grating (TG) technique. This technique has been applied to various photoreceptor proteins and succeeded in determining thermodynamic parameters of transient intermediates during protein reactions, such as enthalpy change, volume change, heat capacity change, and thermal expansion coefficient change. Recently we have developed an instrument to introduce the pressure to this powerful method and expanded its capability toward the time-resolved detection of the 'isothermal compressibility (β_T)', which directly reflects the structural fluctuation and hence is important in the protein science. The fluctuation of a protein is considered to play an important role for its function and attracts much attention. Hence, β_T of reaction intermediates can offer the direct knowledge how the fluctuation is involved in protein reactions. In this article, we briefly review the pressure variable TG method including its principle, a specially designed optical high-pressure cell, and our recent results on the first detection of β_T for intermediates of the protein reaction.

Keywords: transient grating, high pressure, compressibility, fluctuation of proteins



黒井 邦巧 Kunisato Kuroi E-mail: kkuroi@ims.ac.jp



寺嶋 正秀 Masahide Terazima E-mail: mterazima@kuchem.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

熱力学量は、物質の性質や変化を表す化学反応を理解する上で必要不可欠な量である。ところが従来の手法では、 熱力学量は平衡状態にある反応においてしか測定できない ので、短時間で非可逆的な化学反応中に起こる熱力学量変 化を時々刻々と捉えることは不可能であった。しかし近年、 我々は過渡回折格子法(TG法)と呼ばれるレーザー分光 法を用いて、熱力学量の時間分解検出に成功してきており、 「時間分解熱力学」とも呼ぶべき新たな分野を切り開いて いる。¹⁻⁶ 最近ではロドプシン、photoactive yellow protein

(PYP),フォトトロピンなどの光受容タンパク質が起こす 光反応中で起こるエンタルピー変化(ΔH),部分体積変化

 (ΔV) , 熱容量変化 (ΔC_P) , 熱膨張率変化 $(\Delta \alpha)$ などの量 を検出してきた。

こうした熱力学量変化は、反応中に起こるタンパク質分 子全体の構造変化やエネルギー変化を反映し, 過渡吸収分 光法や振動分光法など従来の分光的手法からは得がたい貴 重な情報を提供する。例えば、これまでの分光手法は主に 発色団近傍についての詳細な情報を提供してきたが, 発色 団分子よりもはるかに大きなタンパク質分子では機能に重 要な構造変化が発色団から離れた部位でも起こりうる。こ れに対して,熱力学量はタンパク質分子と周囲の溶媒分子 も含めた包括的な系のダイナミクスを反映するため、より 一般的な反応研究が可能となる。たとえば熱容量変化 (ΔC_P = $(\partial \Delta H / \partial T)_{P}$)からは、主に疎水性残基の露出や埋没を調べ ることができる。我々は、このような観点からタンパク質 反応を明らかにしてきたが、これまでいくつかの実験的な 問題点から、 圧力条件を変えて熱力学量変化を定量するこ とは困難だった。しかし最近, 我々の研究室では, 特殊な高 圧セルを開発して圧力条件を変えながら TG 測定を行うこ とが可能になり、初めて体積の圧力微分量である等温圧縮 率 ($\beta_T = -(1/V)(\partial V/\partial P)_T$)の変化を時間分解で得ることがで きるようになった。

ここでは、そうした研究の内で、最近得られたタンパク 質の反応中における等温圧縮率変化について、解説を行う。 特に、TePixD という多量体光受容タンパク質に適用して、 実際に光反応中間体における構造揺らぎを検出することに 成功したので、この高圧 TG 法の原理や実験手法と得られ た成果について述べる。

2. 圧縮率とタンパク質分子の揺らぎ

近年,タンパク質分子の持つ構造揺らぎが機能に重要で あることが指摘され始めている。^{7,8)} 大きな構造自由度を 持つタンパク質分子は、常温下では熱揺らぎに曝されてそ の構造が最安定構造のまわりを揺らいでいると考えられる が、そのような構造の揺らぎがタンパク質機能に重要な役 割を果たしていることが提案されている。しかし、これま でそうした揺らぎを反応中間体に対して測定する手法がな かったために、揺らぎが反応過程に関与している実験的な 確証が得られないでいた。この点で、タンパク質分子の等 温圧縮率β_rはそのような構造揺らぎを反映する物理量であ り、圧力条件下での TG 測定からこの量を検出することが できれば反応中間体の揺らぎを捉えることが可能になるは ずである。

等温圧縮率は統計力学において体積揺らぎと次の式で結び付けられる。⁹

$$\langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle = k_B T V \beta_T$$

ここで<X>は物理量 X の平均を表し、kB はボルツマン定数、

Tは絶対温度でVが系の体積である。左辺は「体積揺らぎ」 と呼ばれる量であり系の構造の揺らぎを直接的に反映して いる。微視的にはタンパク質分子の圧縮率は分子内部のキ ャビティと表面への水和によって決定される。¹⁰⁻¹²⁾このキ ャビティは圧縮率に対して大きな正の寄与をする一方で、 タンパク質表面の水和水はバルク層の水よりも硬いため、 水和水は負の寄与をする。正の寄与をするキャビティの増 加はそれだけ分子内部に隙間が増加し、タンパク質分子が 柔らかく形状を変えやすくなったと解釈され、また負の寄 与をする水和水が放出されることはタンパク質分子表面を 制限する水分子がいなくなり分子内部の運動を自由にする と解釈できる。

タンパク質分子の圧縮率は、これまでタンパク質溶液の 音速測定を精密に行うことで断熱圧縮率 $(\beta_{S} = -(1/V)(\partial V/\partial P)_{S})$ を求め、それを物理公式によって等 温圧縮率に変換して間接的に求められてきた。13,14)このよ うにして求められた圧縮率はタンパク質機能と相関するこ とが報告されており、構造揺らぎの重要性を示唆している。 例えば月向らはジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の活性部 位から離れたループ領域に変異を導入したものを多く作製 し DHFR の活性部位の構造を変えることなくその断熱圧縮 率(つまり揺らぎ)を変え、これらの変異体で酵素の活性 と各変異体の圧縮率の間に正の相関を見出し, 揺らぎの大 きな変異体ほど大きな活性を持つことを報告している。¹⁵⁾ しかしながら従来の圧縮率の測定法は長時間を要するもの であり時間分解能は全くないと言っていい。我々が開発し た高圧 TG 法は圧縮率の変化を初めて時間分解で与えるも のであり、これによってタンパク質分子の揺らぎの変化を 実時間で追跡することが初めて可能になった。次節ではTG 法の実験原理, 圧縮率変化検出の原理について簡単に述べ る。TG 法の実験原理について詳しくは文献を参照された V. 16,17)

3. 測定原理

3.1 過渡回折格子法(TG法)

TG法では、試料溶液内に2本のパルスレーザーを交差させて干渉縞を生成させる(Fig.1)。するとこの光強度の空間分布に従って溶液内の分子が光励起され、光強度が強い 干渉縞領域でのみ光反応生成物が生じて溶液の屈折率(n) を変化させるので屈折率変化(δ n)によるグレーティング が生成する。ここに連続プローブ光を入射すると、プロー ブ光は回折されるのでこれを TG 信号として観測する。プ ローブ光が試料に吸収されないような条件では、TG 信号の 強度 I_{TG} は屈折率変化の2乗に比例する。すなわち

$I_{TG} \cong \alpha(\delta n)^2$

(2)

ここで α は測定機器の配置や実験条件に依存する定数であ る。生じた屈折率変化は化学反応で起こる熱量変化や体積 変化によって時間変化をし、最終的に熱や分子種の拡散散 逸によって屈折率の空間変調が解消されて TG 信号は消失 する。測定ではこのような TG 信号の時間変化をモニター する。屈折率変化 δn は光反応に伴う熱放出やエンタルピー 変化による寄与(δn_{th})、吸収変化による寄与(δn_{pop})、液中 の分子の部分体積変化による寄与(δn_v)に分けられ、これ らは TG 信号から過渡種の熱力学量を求める上での重要な 役割を果たす。次にこれら各項について述べる。

(1)



Fig.1 Schematic illustration of the transient grating experiment. Spatially modulated δn along the interference pattern shown by the dark and light color is also depicted.

3.2 屈折率変化の寄与と熱力学量

光励起された分子の無輻射緩和に伴う溶媒への熱の放出 や化学反応に伴う溶媒への熱の出入りが起こると、溶液の 温度が変わるので干渉縞に沿って温度勾配ができることに なる。すると屈折率の温度依存性を通して屈折率変化が生 じる。このような過程で生じる屈折率変化は熱グレーティ ング(δn_{th})と呼ばれ、その強度は次のように表される。

$$\delta n_{th} = \frac{dn}{dT} \frac{h \, v \phi W}{\rho C_p} \Delta N \tag{3}$$

ここで h_V は励起光のエネルギー (J), ΔN は単位体積あた りの反応分子数 (L⁻¹), ϕ は熱放出過程の量子収率である。 n, W, ρ, C_P は溶媒に関する物理量でありそれぞれ屈折率, 分子量 (g mol⁻¹), 密度 (g L⁻¹), 定圧モル熱容量 (J K⁻¹mol⁻¹) である。

光反応によって溶質分子の部分体積が変化すると溶液の 密度変化により屈折率変化が引き起こされる。このように して生じる屈折率変化は体積グレーティング (δn_V) と呼ば れ、その強度は反応分子の部分体積変化量 ΔV (cm³ mol⁻¹) を用いて

$$\delta n_V = \left(V \frac{dn}{dV} \Phi \Delta N \right) \Delta V \tag{4}$$

のように表される。ここで溶液は希薄溶液であることから V, nはそれぞれ溶媒のモル体積,屈折率である。 Φ は光化学 反応を起こす量子収率である。 ΔV の値は次のように定量さ れる。吸収した光のエネルギーを全て熱として放出するよ うな熱参照試料((3)式で ϕ =1)を用意して測定試料と全く 同条件で TG 測定を行い、その熱信号強度(δn_h ^{ref})と体積 グレーティング信号(δn_V)の比を取る。すると(2)式にお ける実験定数 α はキャンセルされて

$$\Delta V = \frac{\alpha_{solv} h W}{\rho C_p \Phi} \left(\frac{\delta n_V}{\delta n_{th}^{ref}} \right) \tag{5}$$

のように求められる。ここでα_{solv} (=(1/V)(dV/dT))は溶媒の熱膨張係数であり、上式の括弧内の実験値以外は全て定数であることが分かる。

化学反応によって吸収スペクトルが変化すると Kramers-Kronigの関係式から明らかなように、たとえプロ ーブ光の吸収がない波長においても屈折率を変化させる。 このような原理で起こる屈折率変化はポピュレーショング レーティング (δn_{pop}) と呼ばれる。

3.3 中間体の圧縮率変化の測定原理

(5)式のように TG 信号から体積変化量 ΔV を定量できる ことから、様々な圧力下で TG 測定により ΔV を求めること で、その圧力依存性から等温圧縮率変化 $\Delta \beta_{T}$ を、

$$\left(\frac{\partial\Delta V}{\partial P}\right)_T \approx V\Delta\beta_T \ (\equiv \Delta K_T) \tag{6}$$

として得ることが可能である。ここでVはタンパク質分子 の部分モル体積であるが、一般にVの値は非常に大きく、 それに比べて光反応に伴う部分モル体積変化 ΔV の値は無 視できるほど小さいので $V + \Delta V \approx V$ から上式の関係が成 り立つ。Vの値は既知ではないことが多いので我々は $\Delta \beta_{\Gamma}$ の代わりに $V \Delta \beta_{\Gamma} (\equiv \Delta K_{T})$ を用いて議論をしている。月向ら にならうと K_{Γ} は「等温圧縮量」と呼ばれる量であり、 ΔK_{Γ} は等温圧縮量変化である。上の議論から $\Delta \beta_{\Gamma} と \Delta K_{T}$ の違い は定数倍の違いだけであり、今回の場合、これらの間に本 質的な違いはない。

等温圧縮量変化 ΔK_{T} は次のような原理で基底状態からの 変化として求めることが可能である。まず TG 信号の時間 変化において,熱グレーティング信号が消失した後では, 屈折率変化 δn は体積グレーティング(δn_{v}) と吸収変化由 来のポピュレーショングレーティング(δn_{pop})より成る。 このうち後者については光反応による吸収スペクトル変化 が圧力に依存しなければ,その圧力依存性は無視できる (今回の場合,この仮定は妥当であることを実験的に確認 している)。よって圧力による物理量の変化を Δp と書き表 すことにすると, δn の圧力変化 $\Delta p \delta n$ について

$$\Delta_{\rm P}\delta n = \Delta_{\rm P} (\delta n_V + \delta n_{pop}) \approx \Delta_{\rm P}\delta n_V \tag{7}$$

とできる。さらに δn_V は(4)式で体積変化量と結び付けられる。(4)式の括弧内の各定数について,溶媒の密度の圧力依存性が小さいことからモル体積V,溶液の屈折率n,単位体積あたりの反応分子数 ΔN の圧力依存性は、少なくとも常圧付近においては無視できる。さらに光反応の量子収率を表す Φ の圧力依存性も小さければ、(4)式の δn_V と ΔV を結びつける括弧内は圧力変化に対してほぼ一定で比例定数とみなせる。よって

$$\Delta_{\rm P} \delta n \approx \Delta_{\rm P} \delta n_V \approx \left(V \frac{dn}{dV} \Phi \Delta N \right) \Delta_{\rm P} \Delta V_{g \to i} \tag{8}$$

のように体積変化量の圧力変化分 $\Delta_{P}\Delta V_{g \rightarrow i}$ を得ることがで きる。ここで ΔV の添え字 $g \rightarrow i$ は基底状態 (ground state) から中間体 (intermediate state) 状態への体積変化量である ことを示す。したがって熱参照試料の常圧における熱グレ ーティング強度 (δn_{th}^{ref}) と、 $\Delta_{P}\delta n$ の比 ($\Delta_{P}\delta n/\delta n_{th}^{ref}$)を取る ことで、 $\Delta V_{g \rightarrow i}$ の圧力変化量が求められ、得られた $\Delta V_{g \rightarrow i}$ の 圧力依存性から基底状態から見た中間体の等温圧縮量変化 $\Delta K_{g \rightarrow i}$ が求まる。実験的には、通常の光学セルを用いて常圧 において δn と δn_{th}^{ref} の比を求めた後、圧力セルを用いて δn の圧力依存性を得ることで上式の値が求められる。

4. 高圧セル

前節で示したように TG 信号から等温圧縮量変化を得る ためには, 圧力条件下で TG 信号強度を定量的に測定する 必要がある。その際に問題となるのは TG 信号が実験のセ ットアップに非常に敏感なことであり, そのため加圧操作 によってセル位置が全く動かないことや, サンプル交換に



Fig.2 Schematic drawing of the high-pressure cell (top view) (left) and the inner cell with the cell holder (right).



Fig.3 Observed pressure dependence of the thermal grating signal normalized by that at 0.1 MPa. Closed circles and open diamonds correspond to pressure increasing and decreasing steps respectively. The solid line is the calculated curve by literature.

伴うセル位置の再現性が要求される。これらの要請を満た す高圧光学セルとして Fig.2 のようなセルを作製した。¹⁸⁾ 高圧セルは外部の本体と容量約 0.2 cm³の微小内部セルか ら成り、ハンドポンプを用いて高圧セル本体に圧媒である 水を送り込むことで外部セル内の圧力を高める(最大 450 MPa)。サンプル試料溶液はシリコンチューブが付けられた 内部セルに封入されている。また内部温度は循環水により 温度コントロール可能である。光学窓には比較的広い散乱 角を持たせてあり幅広い格子波数での TG 測定が可能であ る。この圧力セルを用いて測定した熱参照試料の圧力によ る熱グレーティング強度の増大比($\delta n_{th}/\delta n_{th}^{0}$)を Fig.3 に示 す。(δn_{th}⁰は常圧における値である)。Fig.3のプロットでフ ィット曲線は式(3)の各パラメータに水のものを用いて、報 告されている圧力依存性から計算されたものである。文献 値によって圧力による増大比が再現されることから, 作製 した高圧セルは信号強度の定量性を保証していることが分 かった。また図で黒丸は常圧から 400 MPa までの昇圧過程, 白の菱形は減圧過程での測定結果であり、信号強度は圧力 の印加過程によらないことが分かる。

5. 高圧 TG 法の適用例

我々は高圧 TG 法を青色光センサータンパク質 TePixD の 光反応に適用して、その反応中間体の持つ揺らぎを、圧縮 量として検出することを試みた。¹⁹⁾ TePixD はフラビンを 発色団として持つ 17 kDa 程度の比較的小さなタンパク質 であるが、多量体として機能し、環状の 5 量体が 2 つ合わ さった 10 量体構造を持つ(Fig.4)。²⁰⁾ このタンパク質の 光反応は常圧においてよく調べられており, Fig.4 のような 反応を起こすと考えられている。^{21,22)} すなわち 10 量体中 のサブユニット(図中では丸で表される)1 つが光励起さ れると励起されたサブユニットにおいて,吸収変化(図で 濃い色で表現されている)がナノ秒以下の速い時間で起こ って中間体 I₁となり,その後 40 µs の時定数で体積膨張を サブユニット内で起こして中間体 I₂となる(正方形の形状 で構造変化を表現)。最後に,サブユニットが体積変化を起 こした 10 量体は,4 ms の時定数で5 量体 2 つへと解離反応 を起こして,元の暗状態へと回復していく。我々は圧力条 件下でTG 測定を行い,2 つの中間体 I₁ と I₂ の始状態からの 圧縮量変化検出を行った。

あらかじめ吸収法で TePixD の光反応への圧力効果を調 べると、TePixD の過渡吸収スペクトル形状や反応の量子収 率は圧力の影響をほとんど受けなかった。Fig.5 に TePixD の TG 信号の圧力依存性を示す。遅い時間領域に現れる山 型の信号は反応物である10量体と生成物である5量体の拡 散によって現れる分子拡散信号であり、矢印が示すように 圧力増加とともにピーク強度は顕著に減少していた。一方



Fig.4 The crystal structure of TePixD decamer (upper left) and monomer (upper right). The schematic illustration of its photoreaction is depicted (lower). The meanings of shapes (circles and squares) and colors are explained in the text.



Fig.5 Pressure dependence of the TG signal of TePixD. Pressure increases from 0.1 MPa to 200 MPa in the direction of arrows. The expanded figure of the volume change signal is depicted in the inset.

でインセット内の図は中間体 I₁から I₂への体積変化過程の TG 信号を拡大したもので,矢印が示すように圧力の増加 とともに顕著に強度が増加していた。この体積変化の信号 を解析することで,中間体 I₁, I₂ が持つ屈折率変化 δn (I₁), δn (I₂)が各圧力で得られるので,前述の原理によって始状 態から中間体 I₁, I₂ までの体積差 ΔV (I₁), ΔV (I₂)の圧力依存性 を Fig.6 のように得ることができた。ここで ΔV の絶対値は 分からないので図のプロットでは常圧における ΔV (I₁)の値 を基準点に取ってある。プロットの常圧における ΔV (I₁)の値 を基準点に取ってある。パロットの常圧における ΔV (I₁)の値 を基準点に取ってある。パロットの常圧における ΔV (I₁)の値 でm³ MPa⁻¹ mol⁻¹ と求められた(ここで mol は TePixD モノマ ー1 mol あたりのことである)。 ΔK_T の値が正であることは, TePixD の揺らぎが反応に関与していることを示唆する。

ところでTePixDには特殊な励起光強度依存性があり、強 い励起光強度によって 10 量体中のサブユニット複数が励 起されると、励起された各サブユニットは吸収変化と体積 変化を起こして I1, I2 状態となるが, 10 量体の解離反応は起 こらなくなる。23) 我々はこの性質を利用して, 揺らぎ増大 と反応との関係を検証することにした。そのために励起光 強度を上げながら同様の測定を行った。解析の結果, サブ ユニット2個が励起されて解離反応が起こらなくなった場 合, $\Delta K_{\rm T}({\rm I}_1)$, $\Delta K_{\rm T}({\rm I}_2)$ の値として-4.3 × 10⁻² cm³ MPa⁻¹ mol⁻¹, -6.7 × 10^{-2} cm³ MPa⁻¹ mol⁻¹ と負の値が得られた (Fig.7)。つまり 10 量体の解離反応が「起こる,起こらない」に対応して反 応中間体において揺らぎが「増大,抑制」されていること になり、中間体の揺らぎが反応に関与していることを直接 示すことができた。得られた圧縮量変化の絶対値はモノマ 一全体の圧縮量の高々10%程度と見積もられたが、この揺 らぎの増大は反応にとって重要な領域に局在しているので はないかと推察している。一方,なぜ複数のサブユニット が励起されたときに揺らぎが減少するのかは解釈が難しい。 10 量体の環の中でサブユニット1 つが励起された時が環構 造の歪みが最も大きくなり,環の中の励起されたモノマー の揺らぎが増大されるが、複数のサブユニットが励起され るとそうした効果が解消されて安定化し、むしろ揺らぎが 抑えられるのかもしれない。



Fig.6 Pressure dependence of the volume change of I_1 and I_2 states measured from the ground state. Solid lines are fitting curves by a quadratic function of pressure.



Fig.7 Schematic illustration of the observed compressibility change of I_1 and I_2 states from the ground states along the reaction coordinate, depicted for both cases of 'one subunit excitation' (upper) and 'two subunits excitation' (below).



Fig.8 Specific volume (v) of TePixD measured at various pressures less than 40 MPa. The solid line '1' represents the gradient in the range between 0.1 and 10 MPa, and '2' represents the one between 20 and 30 MPa. These gradients correspond to ' $K_{\rm T}$ ' at their pressure intervals.

最後に分子拡散信号の圧力依存性について述べておこう。 Fig.5 の圧力依存性を見ると、分子拡散信号(山型の信号) が少し圧力をかけただけで劇的に減少していることがわか る。この顕著な圧力依存性は何を意味するのであろうか。 その原因について調べると、次の様にこの圧力依存性にも 構造揺らぎが関係していることが示唆された。24) 分子拡散 信号のピークは、10量体の解離反応が起こったことを意味 するので圧力によるピーク強度の減少は「解離反応の量が 減ったこと」を意味する。その原因として、基底状態で存 在する10量体の量が圧力によって減少することや、反応速 度が極端に落ちてしまうことなどが考えられるが、他の測 定と組み合わせて詳しく検討したところ,原因は解離反応 の量子収率が圧力で減ったことであるとわかった。すなわ ち,中間体 I1, I2 までの生成は圧力を印加しても起こるが, 最後の解離過程のみが圧力印加によって阻害されるという ことである。このことは先ほど見た10量体中のサブユニッ トの複数励起による反応の停止とよく似ている。我々は中 間体I1, I2が持つ揺らぎが圧力により減少しているのではと 類推したが、Fig.6の体積変化を圧力に対してプロットした 図はほぼ直線であり、圧縮量差 $\Delta K_{\rm T}$ がほぼ圧力依存しない

ことを意味する。しかし、この値は光励起によって誘起さ れる差の値であり、差の値が圧力依存していなくとも圧縮 量の絶対値 K_Tは圧力で依存している可能性がある。そこで 圧力条件下で適用できる振動式密度計²⁵⁾を用いて TePixD の部分比容を圧力下で測定したところ、Fig.8のような結果 を得た。図で縦軸が試料タンパク質の体積で横軸が圧力な ので、図における傾きが圧縮量の絶対値 K_Tにあたる。図に おいて低圧力における傾き(図内の線分1)より高圧力に おける傾き(図内の線分 2)の方が明らかに小さいことが 分かり、TePixDの圧縮量KTが圧力増加により減少している ことが分かった。用いた圧力は 40 MPa 以下とかなり小さ な圧力であり、このような小さな圧力で圧縮量(圧縮率) が影響を受けるのは、TePixDが10量体と巨大な会合体であ り、そのサブユニット間が容易に圧縮されるせいなのかも しれない。実際タンパク質間の相互作用は 100 MPa 以下の 圧力で容易に変わりうることが知られている。²⁶⁾ この結果 から、10量体内のサブユニット間の圧縮によって10量体構 造の柔軟さ、つまり揺らぎが奪われ、それが解離反応を阻 害しているのではないかと考えている。

以上のことをまとめると、光励起によって反応中間体で 揺らぎが増大することが TePixD の解離反応にとって重要 な役割を果たすが、その足場として定常状態で持つ10量体 の揺らぎも必要であると言えそうである。

6. おわりに

TG 法を圧力条件下で用いることで等温圧縮率を時間分 解で測定することが初めて可能になり、時間分解熱力学の 幅が更に広がった。これによってタンパク質分子の構造揺 らぎを反応過程で検出できるようになった。本稿の最後に その適用例を示したが、これから他の系にも多く適用しな がら揺らぎと反応の関係の理解を深めていく必要があるで あろう。本稿では圧縮率検出という点に焦点を合わせて高 圧 TG 法を解説したが、TG 法は拡散係数の変化からタンパ ク質分子の全体構造の変化がモニターできる強力な手法で あるので、圧力条件下で TG 法を用いることでタンパク質 反応に圧力がどのように影響するのかについての知見も提 供しうる。圧力効果を通じて、例えば活性化体積などから タンパク質反応の物理化学的性質の理解を深めたり、深海 生物の持つタンパク質の反応理解につなげたりすることも 期待できる。

文 献

- M. Sakakura, S. Yamaguchi, N. Hirota, and M. Terazima, J. Am. Chem. Soc. 123, 4286-4294 (2001).
- Y. Nishioku, M. Nakagawa, M. Tsuda, and M. Terazima, *Biophys. J.* 83, 1136-1146 (2002).
- K. Takeshita, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, and M. Terazima, *Biochemistry* 41, 3037-3048 (2002).
- K. Inoue, J. Sasaki, M. Morisaki, F. Tokunaga, and M. Terazima, *Biophys. J.* 87, 2587-2597 (2004).
- J. S. Khan, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, and M. Terazima, J. Am. Chem. Soc. 128, 1002-1008 (2006).
- T. Eitoku, Y. Nakasone, K. Zikihara, D. Matsuoka, S. Tokutomi, and M. Terazima, *J. Mol. Biol.* **371**, 1290-1303 (2007).
- 7) K. Henzler-Wildman, and D. Kern, *Nature* **450**, 964-972 (2007).
- 8) 寺嶋正秀, 揺らぎ・ダイナミクスと生体機能:物理化 学的視点から見た生体分子, 化学同人 (2013).
- A. Cooper, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2740-2741 (1976).
- 10) 月向邦彦, 熱測定 31, 186-193 (2004).

- 11) T. V. Chalikian, M. Totrov, R. Abagyan, and K. J. Breslauer, J. Mol. Biol. 260, 588-603 (1996).
- 12) K. Gekko, Biochim. Biophys. Acta 1595, 382-386 (2002).
- 13) K. Gekko and Y. Hasegawa, *Biochemistry* **25**, 6563-6571 (1986).
- 14) K. Gekko and H. Noguchi, J. Phys. Chem. 83, 2706-2714 (1979).
- 15) K. Gekko, T. Kamiyama, E. Ohmae, and K. Katayanagi, J. *Biochem.* 128, 21-27 (2000).
- 16) 寺嶋正秀, 熱測定 29, 208 (2002).
- 17) M. Terazima, J. Photochem. Photobiol., C 3, 81-108 (2002).
- 18) Y. Hoshihara, Y. Kimura, M. Matsumoto, M. Nagasawa, and M. Terazima, *Rev. Sci. Instrum.* 79, 034101 (2008).
- 19) K. Kuroi, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi and M. Terazima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14764-9 (2014).
- 20) A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto, M. Ikeuchi, and K. Miki, J. Mol. Biol. 349, 1-9 (2005).
- 21) K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima, *J. Mol. Biol.* **386**, 1290-1300 (2009).
- 22) K. Kuroi, K. Tanaka, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima, *Photochem. Photobiol. Sci.* 12, 1180-1186 (2013).
- 23) K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima, *FEBS Lett.* 585, 786-790 (2011).
- 24) K. Kuroi, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, T. Kamiyama, and M. Terazima, J. Phys. Chem. B 119, 11 (2015).
- 25) K. Gekko, M. Araga, T. Kamiyama, E. Ohma, e and K. Akasaka, *Biophys. Chem.* 144, 67-71 (2009).
- 26) B. B. Boonyaratanakornkit, C. B. Park and D. S. Clark, *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 235-249 (2002).