

H/D 交換反応の活性化エネルギーからみたピロリドンカルボキシルペプチダーゼの大規模な立体構造の揺らぎ

関西学院大学大学院理工学研究科
物理学専攻 瀬川研究室 藪本 和義

天然状態 (N 状態) にあるタンパク質の立体構造は水溶液中で揺らいでいる。NH 基が溶媒に露出した状態 (オープン構造) にあるタンパク質の構造の特徴を知るために、ピロリドンカルボキシルペプチダーゼ (PCP と略す) の主鎖 NH 基の H/D 交換反応を起こさせ、NMR 分光法によって残留プロトン量を観測して、アミノ酸残基毎に H/D 交換反応の速度定数と活性化エネルギーを測定した。その結果、PCP の立体構造の中で一番固い部分が溶媒に露出する反応は、PCP が、その折りたたみ反応の初期構造である D_1 という状態と N 状態の間を協同的に構造変化して揺らぐ過程であることが分かった。この部分の H/D 交換反応は $pD_{2.9}$ 、 $50^\circ C$ のもとで約 7.5hr という時定数で進行するが、この反応の律速過程は $N \rightarrow D_1$ へのアンフォールディング過程であることが分かった。H/D 交換反応が大規模な立体構造の揺らぎで媒介される場合、これまで多くの研究例において、溶媒に露出したアミノ酸残基固有の H/D 交換速度: k_{int} (intrinsic rate) と $N \rightleftharpoons U$ の平衡定数の積が実験的に測定される H/D 交換反応速度に等しいという結果であった。したがって、立体構造の揺らぎの速度定数そのものは測定できなかった。しかし PCP の場合は、H/D 交換の見かけの反応速度が直接大規模な構造揺らぎの反応速度そのものに等しいという貴重なデータを与える結果となった。その立体構造の揺らぎの大きさは、活性化エネルギーで約 60 kcal/mol という大規模なものであった。

さらに、H/D 交換反応の時定数をアミノ酸残基ごとに検討すると、PCP の大部分の 2 次構造部分では、 D_1 状態へのアンフォールディングの時定数そのものが H/D 交換反応時間にほぼ等しいのに比べ、C 末端の $\alpha 6$ ヘリックス (残基 190~204) 領域だけは、H/D 交換反応時間がアンフォールディング時間の約 1.4 倍になるものと約 3 倍になるものが混在していた。3 倍になる残基はすべて疎水性残基であることが分かり、この実験結果は、 D_1 状態において $\alpha 6$ ヘリックスだけが、H/D 交換反応から弱くプロテクトされた状態にあり、そのプロテクション因子が約 13 であることが明らかとなった。この実験は、タンパク質内部の固い 2 次構造部分の H/D 交換反応が、確かに大規模な立体構造の揺らぎによって起きることを直接証明し、それが折りたたみ反応の初期構造そのものに等しく、タンパク質の一部が残留構造を保持していることを明瞭に証明した。