

氏 名 山 本 晃 司

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第448号

学位授与の日付 平成12年3月24日

学位授与の要件 数物科学研究科 機能分子科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Construction of a Novel Nanosecond Temperature Jump
Apparatus and Its Application to Time-Resolved Raman
Studies on Protein Dynamics

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 田 中 晃 二
教 授 北 川 禎 三
助 教 授 森 田 紀 夫
助 教 授 田 原 太 平
教 授 濱 口 宏 夫 (東京大学)

論文内容の要旨

タンパク質のフォールディング・アンフォールディング構造転移ダイナミクスの解明は、重要な問題のひとつである。この構造転移ダイナミクスを研究する方法として、ミックスド・フロー法やストップ・フロー法を用いた、温度ジャンプ・pHジャンプ・濃度ジャンプなどが反応スタートトリガーとして用いられてきた。しかし、従来の方法では、装置限界として、サブミリ秒の不感時間が存在し、ナノ秒からマイクロ秒での速い時間領域での構造転移に関する情報を得ることができなかった。この問題の克服には、高速な反応スタートトリガーとしてレーザー誘起温度ジャンプを用いる方法が有効である。レーザー誘起温度ジャンプの時間分解能は、レーザーのパルス幅と励起（電子または振動）分子の熱平衡化に要する時間により決定する。このため、構造転移開始後、数十ピコ秒の追跡が可能である。最近、この方法がポリペプチドやタンパク質に適用され、熱フォールディング・アンフォールディング構造転移反応の初期過程追跡が行われてきた。しかし、これらの研究は、タンパク質中のトリプトファン残基の蛍光測定や骨格の振動に由来するアミド I の赤外吸収測定に限られている。このため、タンパク質の構造安定性に強く関係するジスルフィド結合などの側鎖の構造変化は未だに不明なままである。

本研究の目的は、近赤外レーザー誘起温度ジャンプによりタンパク質の構造転移を開始し、時間分解ラマン分光法を用いて構造転移ダイナミクスを解明することである。ラマン分光法の第1の特色は、ほぼ全ての波数領域で水中のタンパク質の測定が可能なことである。ラマン散乱測定において、水のラマン散乱強度は非常に弱いため水の妨害を受けにくい。このことは赤外吸収測定において、水の強い吸収による妨害により測定できる波数領域が限られることと対照的である。第2の特色は、タンパク質側鎖の変化を直接観測することが可能なことである。ジスルフィド結合やメチオニン側鎖は、ラマン散乱に特異的かつ構造に敏感なバンドを与える。また、チロシン側鎖は水素結合性に敏感なバンドを与える。それぞれのバンドの情報を、一度に測定することが可能である。これらの特色に加えて、ストークス光とアンチストークス光の散乱強度比から試料の温度上昇を直接測定することが可能なことが挙げられる。近赤外レーザー誘起温度ジャンプ法と時間分解ラマン分光法を組み合わせた手法は、タンパク質の構造転移ダイナミクスの追跡に限られた手法ではなく、広く熱励起反応ダイナミクスの追跡に応用できる手法である。

本研究において、(1)時間分解ラマン分光法に適用可能な温度ジャンプ装置の製作および装置の性能評価と(2)この装置をウシ臍臓リボヌクレアーゼAに適用し、熱アンフォールディングの初期過程の追跡を行った。これは、この手法をタンパク質への適用に成功した世界で初めての報告である。

温度ジャンプ装置の製作と性能評価

水の近赤外吸収を利用して、近赤外パルス光を入射することにより水の加熱を行った。以後、レーザー誘起温度ジャンプに用いる近赤外光をヒート光と呼ぶ。ヒート光として、Q-スイッチ Nd:YAG レーザーの基本波を水素ガスまたは重水素ガスでラマンシフトした波長 1.89 μm 、1.56 μm のパルスを用いた。水素でシフトしたヒート光は、通常用いられる単一パス法により温度ジャンプに必要な強度を得ることができた。一方、重水素でシフトしたヒート光は、単一パス法では十分な出力を得ることができず、誘導ラマンシード増幅

法によりはじめて温度ジャンプに必要な強度を得ることができた。試料を均一に加熱するため、ヒート光を試料の双方向から入射した。さらに、試料の厚さは水の吸光係数により制限されるため、1.89 μm ヒート光では 100 μm 、1.56 μm ヒート光では 2 mm の厚さにした。温度プローブ分子として 1.5 M のモリブデン酸水溶液を使用し、ラマン励起光にはもう 1 台の Q-スイッチ Nd:YAG レーザーの 2 倍波を用いた。ヒート光とラマン励起光の遅延時間を変えて時間分解スペクトルを測定し、ストークス光とアンチストークス光の散乱強度比から試料の温度を計算した。この結果から、ヒート光による温度ジャンプが、ヒート光のパルス幅（9 ナノ秒）で達成されることを直接確かめることができた。温度ジャンプ幅は、1.89 μm ヒート光では 30 °C、1.56 μm ヒート光では 9 °C であった。温度ジャンプ測定の大時間限界は熱拡散によらず、加熱された試料の交換により決まることが分かった。

ウシ腭臓リボヌクレアーゼ A の熱アンフォールディング初期過程の追跡

ウシ腭臓リボヌクレアーゼ A は熱フォールディング・アンフォールディングが可逆的に起こることで知られている。熱アンフォールディングに伴い、リボヌクレアーゼ A のラマンスペクトルは S-S 伸縮振動バンド、C-S 伸縮振動バンド、チロシンダブレット、活性部位についての硫酸イオンのバンドが大きく変化する。S-S 伸縮振動のバンドシフトはジスルフィド結合の立体配座の転移、C-S 伸縮振動バンドの強度減少は C-C-S の立体配座の転移、チロシンダブレットの強度比変化はフェニル水酸基への水素結合の強さの変化、硫酸イオンのバンド強度増加は硫酸イオンの活性部位からの遊離による。これらをタンパク質構造のマーカーバンドとして、リボヌクレアーゼ A の熱アンフォールディング過程の追跡を行うことができる。

まず、温度ジャンプに 1.89 μm ヒート光を用い、リボヌクレアーゼ A のラマン測定を試みた。しかし試料の厚さが 100 μm であるため、タンパク質の十分なラマン散乱強度を得ることができなかった。そこで、試料を 2 mm の厚さで測定を行うことができる 1.56 μm ヒート光を用いて、温度ジャンプを行った。時間分解ラマン測定は、59 °C、pH 5.0 のリボヌクレアーゼ A 水溶液に 9 °C の温度ジャンプを行い、遅延時間 200 ns、100 μs 、5 ms で行った。温度ジャンプ後 5 ms 以内の時間分解ラマンスペクトルでは、S-S 伸縮振動およびチロシンダブレットのバンド変化は観測されなかった。一方、C-S 伸縮振動のバンド強度減少は 200 ns で、また硫酸イオンのバンド強度増加は 100 μs で観測された。これらの結果は、リボヌクレアーゼ A の熱アンフォールディング過程が二状態転移で起こるのではなく、タンパク質の部位により異なった複数の転移から成ることを示す。X 線により得られた立体構造との比較から、熱アンフォールディング初期過程で変化した残基は活性部位の近くに存在し、変化しなかった残基はジスルフィド結合の近くに存在すると推察される。このように動き易さの異なる部位がタンパク質分子内に存在することが、活性に深く関係していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は英文で書かれており3章から構成されている。第1章は蛋白質のフォルディング／アンフォルディングに関するこれまでの研究例と問題点、第2章はナノ秒温度ジャンプ装置の製作と性能評価、第3章はその装置を用いたウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) の熱アンフォルディングを研究した成果が記載されている。

第1章ではタンパク質のフォルディング／アンフォルディングの研究背景が説明されており、それらの大部分がアンフォルディングからフォルディングの研究でありながら、その2次構造形成が速く不感時間にあるため、その検出用に速いプローブの開発が必要な事はよく理解された。申請者の口述試験ではフォルディング状態からアンフォルディングに向かう研究の背景に関して十分な記述がされていない事が指摘されたが、その方面の研究がほとんどなく、本研究が最初の研究ならば、ナノ秒温度ジャンプ装置の製作とともに、もっと広い研究の意義があると思われた。この分野における本研究の位置付けをもう少し明確に記述しておくべきであるとの印象が強かった。

第2章では水の近赤外吸収帯の波長のナノ秒レーザーパルス照射して、ナノ秒で温度上昇を起こさせる装置の制作が詳細に記載されている。水の吸収波長に合致するレーザーパルスはガスの誘導ラマン散乱を用いて作られていた。N₂は誘導ラマン断面積が小さいこと、CH₄は光反応が起るため時間経過とともに出力が減少することで不適切であったことから、申請者はH₂とD₂を詳細に検討している。H₂は単一パスの普通の方法で誘導ラマン散乱が起り1.89 μ mの光パルスが得られた。水の吸収係数が大きいため30 $^{\circ}$ Cの温度ジャンプが得られたが、この波長ではセルの厚さが0.1mmに制限され、タンパク質溶液にはシグナルが弱くて使えなかった。一方、D₂はH₂と違って誘導ラマン散乱が起りにくかったが、シード増幅法という複雑なシステムを用いて1.56 μ mのパルス光をつくり出す事に成功していた。この波長では2mmの厚さのセルが使用可能であり、10ナノ秒に9 $^{\circ}$ Cの温度上昇が実現する事を、モリブデン酸イオンのアンチストークス／ストークスラマン線強度比より決めた。この温度上昇は照射レーザーの時間帯で起り、5ミリ秒まで持続することを、532nm励起の時間分解ラマン分光で確認した。H₂とD₂の誘導ラマンは何がどう違うかについて非常に詳しく調べており、この章だけで学位論文に匹敵する内容を含んでいる。

第3章はRNase Aというこの分野で常にテストに使われるタンパク質に本装置を適用した結果が記述されている。59 $^{\circ}$ Cから温度ジャンプした時のラマンスペクトルの変化をS-S伸縮、C-S伸縮、チロシンダブレット、SO₄²⁻イオンのバンドに注目して調べられている。定常状態にある蛋白質の温度変化を測定してどの程度のスペクトル変化が期待されるかを示した後、9 $^{\circ}$ Cの温度ジャンプ後、-100ナノ秒、200ナノ秒、100マイクロ秒、5ミリ秒の時間分解スペクトルを観測した結果が示され、解析されている。シグナル／ノイズ比は十分高いとは言えないが、詳細な解析が行われていた。結論的にはメチオニンのC-S伸縮バンドが200ナノ秒に強度減少し、SO₄²⁻イオンのバンドが100マイクロ秒後に変化するが、S-S伸縮バンドは変化せず、また変化したバンドも期待した量の20%程度であることが明らかにされた。5ミリ秒で何故20%しか変わらないのかは残された問題で、第1章の背景の記述にも関係する。結論はタンパク質のアンフォルディングは協奏的に起るのでなく、各部分別々に起ると言う事であり、これから色々な議論を巻き起こすかも知れない斬新なものである。

本研究は、ナノ秒温度ジャンプ装置を制作し、その性能を詳細に調べた事に第一の意義がある。さらに、その装置を用いてタンパク質のアンフォルディングを10ナノ秒の時間分解能で観測した最初の研究成果であり、学位論文としては十分であると審査員全員の意見が一致した。

本人が論文内容を約1時間かけて説明し、その後審査員との質疑応答に1時間半かけた。H₂とD₂とで誘導ラマン散乱効果が何故大きく違うのかという質問に対しては満足な説明が与えられ、この事に関する申請者のバックグラウンド知識の高さがよくわかった。ナノ秒温度ジャンプ装置の性能やその装置の意義について高く評価されたが、それをタンパク質

のアンフォルディングに適用した研究の意義について、十分な説明でないことが指摘された。しかし、学位論文の試験としては標準を十分越えていること、論文も分かりやすい英語で書かれていて、語学力も十分であると判断した。公開発表会における発表も分かりやすいもので、質疑に対する応答も満足できるものであった。

従って、試験に合格ということで全審査員の意見が一致した。