

熱からみえるタンパク質機能

緋田安希子

酵素による物質変換，受容体を起点とするシグナル伝達，抗体抗原反応による免疫応答—タンパク質の機能という、それにより生じる“結果”に目がいきがちではないだろうか。しかし、タンパク質はその相方となる分子との相互作用なくして機能を発揮することはできない、そしてその分子間相互作用には必ず“熱”の出入りが伴う、という観点からタンパク質の機能を見てみるとどうだろう。

それを測定する方法に、等温滴定熱量測定 (Isothermal titration calorimetry, ITC) がある。この方法は、溶液Aに対して溶液Bを滴定し、その際に発生する熱量変化を測定することでA-B間の相互作用を評価するという非常に単純なものである。そのため、AとBには化合物、核酸、タンパク質など低分子から高分子までさまざまな分子を適用可能である。そして、修飾や固定化を必要としないため、天然に近い状態での解析が可能である。このITCを用いることで、大きく4つのことを明らかにできる：①相互作用の有無、②結合の強さ、③結合比、④結合の種類。本稿では主に、受容体-リガンド間相互作用および酵素-基質間相互作用の解析について紹介したい。

生体内にはさまざまな受容体が存在するが、ここでは細菌の走化性受容体を例にとる。走化性受容体とは運動性細菌が周囲の化合物を感知し、その濃度勾配にしたがって好ましい環境へと移動するのに重要な働きを担う受容体である。Rico-Jiménezらは緑膿菌の3種類のアミノ酸走化性受容体について、各受容体のリガンド結合ドメインのみを精製し、これに対し20種類のL-アミノ酸をそれぞれ滴定するITC解析を行っており、各受容体がどのアミノ酸を認識するか、そしてその強さである解離定数 (K_d) についてカタログ化に成功している¹⁾。分子間相互作用において親和性を表す K_d は重要な情報であるが、ITCで得られるのはこれだけでない。ITCでは、その相互作用に関するエンタルピー変化 (ΔH) やエントロピー変化 (ΔS)、ギブス自由エネルギー変化 (ΔG) といった熱力学パラメーターも決定することができ、ここから結合の種類を推定することも可能である。自発的な反応の場合 ΔG は負であり、その値と比較して、 ΔH の寄与が大きい場合には水素結合やファンデルワールス相互作用が関与する特異性が高い結合パターンであると予測され、 ΔS の寄与が大きい場合には疎水性相互作用が関与する特異性の低い結合パターンであると予測でき

る。前者は発熱反応、後者は吸熱反応を示す。先の研究では、同じ受容体に対してグルタミンでは発熱反応、アルギニンやメチオニンでは吸熱反応といったように滴定するアミノ酸によって熱量変化に差が見られ、リガンドの種類によって結合様式が異なることが議論されている¹⁾。また、他の走化性受容体研究では、ITCを用いることで走化性を誘導しない化合物が受容体に結合することを証明している²⁾。これは走化性を示すという結果に着目した解析では絶対に見つからなかったリガンドであり、ITCはこうしたアンタゴニストの解析にも有効であるといえる。

ITCではこのような受容体とリガンドの結合解析だけでなく、酵素反応の解析も可能である³⁾。トリプシン溶液に対してその基質のN-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステルを滴定したITC試験では、データ解析によりMichaelis-MentenプロットおよびLineweaver-Burkプロットを作成することで得られたミカエリス定数 (K_m) および代謝回転数 (k_{cat}) の値が文献値とほぼ同等であることが報告されている⁴⁾。この研究ではさらに、阻害剤であるベンズアミジンを添加したトリプシン溶液に対して基質を滴定することで、阻害剤の評価も行っている。それにより得られた阻害定数 (K_i) も文献値と近い値であり、ITCは単なる酵素反応だけでなく阻害剤の評価にも有効であることが示されている。また、北奥らは触媒残基をアラニンに置換した変異型キチナーゼを用いて、基質であるキチンオリゴ糖 (GlcNAc_n , $n = 3-6$) との結合を解析している⁵⁾。このように変異型酵素を用いることで、酵素の基質分解効果を取り除き、受容体とリガンドの結合測定のように、酵素と基質の結合を解析することも可能である。

以上のように、タンパク質の機能をその起点である相互作用に着目して解析してみるのも一つの手段である。今まで見えてこなかった何かが“熱”から見えてくる、ということもあるかもしれない。

- 1) Rico-Jiménez, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **88**, 1230 (2013).
- 2) Bi, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16814 (2013).
- 3) Mazzei, L. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **567**, 215 (2016).
- 4) 麻見安雄: 熱測定, **44**, 29 (2017).
- 5) 北奥喜仁, 大沼貴之: 化学と生物, **53**, 834 (2015).