

特集：ソフトな相互作用による膜インターフェイスの機能制御

NMR によるソフトな分子間相互作用解析法の開発と
光合成明反応電子移動タンパク質間相互作用への応用

松本昌彦, 上田卓見, 嶋田一夫

生体膜インターフェイスにおけるタンパク質複合体の多くは、半永久的に形成されるものではなく、結合状態と解離状態を交換するものであることが知られている。当研究室では、そのような高分子量タンパク質複合体の相互作用様式を、NMR 法を用いて構造生物学的に解明することを可能とする、転移交差飽和法 (TCS 法) を開発した。本稿では、TCS 法の理論を確立し、リガンドとレセプターの相互作用を単純化したモデルスピ系に対してシミュレーションすることにより、TCS 法の実験条件を最適化する方法について紹介する。さらに、確立した実験条件に基づいて、プラストシアニンと、光化学系 I ならびにシトクロム b_6f との相互作用様式を解明した結果について紹介する。

生体膜インターフェイスにおけるタンパク質相互作用は、細胞接着やシグナル伝達、物質輸送などの多くの重要な機能を司る。このような相互作用の多くは、半永久的に形成されるものではなく、結合状態と解離状態を交換するものであることが知られている¹⁾。例えば、多くのイノシトールリン脂質を認識するタンパク質では、イノシトールリン脂質との相互作用と、生体膜の他の成分との相互作用が共存することで、はじめて高い親和性を獲得し、特定の生体膜に高い選択性で移行することが可能となると考えられている²⁾。また、T 細胞と抗原提示細胞との間の認識は、多数の低親和性のタンパク質-タンパク質相互作用により行われていることが知られている³⁾。

NMR 法では、溶液を測定対象としているため、結合・解離平衡を取り扱うことが可能である。しかし、生体膜インターフェイスにおけるタンパク質複合体には、膜貫通タンパク質や細胞外マトリックス等により構成されるよう

な、高分子量をもつものが多いため、従来の NMR 手法を適用することは困難であった。

そこで当研究室では、高分子量タンパク質複合体の相互作用様式を構造生物学的に解明することを可能とする、転移交差飽和法 (TCS 法) を開発した^{4,5)}。当研究室ではこれまでに TCS 法を用いて、イオンチャネルとポアープロッカー^{6,7)}、コラーゲンとコラーゲン結合タンパク質^{8,9)}、膜透過抗菌ペプチドとリポソーム¹⁰⁾などの結合様式を解明した。

しかし、これまでは、TCS 実験を定量的に行うための理論や実験法が十分に確立していなかったため、本来は複合体におけるレセプター・リガンド間の距離情報を有する TCS 実験の結果を定性的に取り扱い、また、最適な TCS 実験条件の設定および適応限界を論じることも困難であった。

本稿では、TCS 法の理論を確立し、リガンドとレセプターの相互作用を単純化したモデルスピ系に対してシミュレーションすることにより、TCS 法の実験条件を最適化する方法について紹介する。

1. 転移交差飽和法 (TCS 法) の概略

NMR で観測することが可能なタンパク質と、NMR で直接観測することが難しい巨大タンパク質とが相互作用す

東京大学大学院薬学系研究科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Development of NMR methods for soft protein-protein interactions and their application to photosynthetic electron transfer protein interactions

Masahiko Matsumoto, Takumi Ueda, and Ichio Shimada (7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

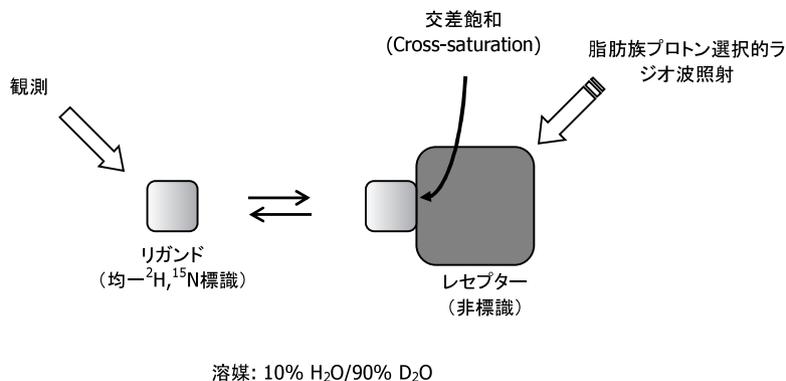


図1 転移交差飽和法 (TCS法) の概略

る系を考え、前者をリガンド、後者をレセプターと呼ぶ。図1に示すように、TCS法では、非標識のレセプターに対して過剰量の均一²H, ¹⁵N標識したリガンドを加え、10% H₂O/90% D₂Oの溶媒を用いたNMR試料を調製する。この条件により、リガンド分子内のプロトン密度が低くなり、また、レセプター分子のみに脂肪酸水素が存在することになる。

この試料に対して、脂肪酸プロトンの周波数をもつラジオ波を照射すると、レセプターの脂肪酸プロトンの磁化が飽和される。磁化の飽和は、¹H-¹H間の双極子-双極子相互作用により、空間的近傍にあるプロトンに連鎖的に伝播する。飽和の伝播は、¹H-¹H間の距離が短いほど速く、また分子の回転相関時間が大きいほど速くなるので、高分子量かつプロトンが高密度に存在するレセプター分子内では、芳香族プロトンやアミドプロトンなどのラジオ波を直接照射されていないプロトンへも速やかに飽和が伝播する。また、磁化の飽和は複合体の結合界面近傍にあるリガンド分子のプロトンにも伝播する。リガンド分子内ではプロトン密度が低いため、飽和の伝播は遅い。その結果、レセプターからリガンドに伝播する磁化の飽和は、リガンド上のレセプターとの結合界面近傍のプロトンに限局される。

さらに、リガンドとレセプターが結合・解離を繰り返している場合、リガンドが複合体形成時に受けた飽和は、解離状態のリガンドにも転移する。

実際の実験では、ラジオ波を数百ミリ秒～数秒間照射した後、¹H-¹⁵Nシフト相関スペクトル (¹H-¹⁵N HSQC スペクトル) を測定する。¹H-¹⁵N HSQC スペクトルでは、解離状態のリガンドのアミド基に由来するNMRシグナルが、アミノ酸残基ごとに観測される。アミドプロトンの磁化の飽和はシグナルの強度減少として観測されるので、ラジオ波を照射した場合としない場合で測定したそれぞれのスペクトルのシグナル強度の比を残基ごとに求める。レセプターから空間的近傍にあるプロトンほど飽和を強く受けるので、他の残基に比べて大きくシグナル強度が減少した残基を結合界面残基とする。

TCS法は、解離状態のNMRシグナルを用いて複合体形成時の構造情報を抽出する方法であるため、複合体のNMRシグナルを観測することが困難であるような巨大な複合体に対しても適用することが可能である。

2. 転移交差飽和法の理論的記述

2-1. Isotopomer

TCS法に類縁の方法として、転移核オーバーハウザー効果 (trNOE) 法^{11,12)}, saturation transfer difference (STD) 法^{13,14)}が挙げられる。これらはいずれも、双極子-双極子相互作用を利用して、解離状態のNMRシグナルを用いて複合体形成時の構造情報を抽出する方法である。trNOE法およびSTD法については理論が確立しており、シミュレーションを行うことも可能になっている。

しかし、TCS法ではリガンド分子内のプロトン密度を低くするために、リガンド中の全ての非交換性水素を少なくとも95%以上の標識率で²H標識した上で、さらに10% H₂O/90% D₂Oの溶媒を用いる点が、trNOE法およびSTD法と異なる。その結果、TCS実験で用いるサンプル中のリガンドおよびレセプターは、その交換性水素が様々なパターンで¹Hが²Hに占有されている。このような同位体組成が異なる異性体はisotopomerと呼ばれる。isotopomer毎に¹Hの空間的配置が異なるので、飽和の伝播効率も異なり、観測されるまでに受ける飽和の程度も異なる。TCS実験の結果には、各isotopomerが受ける飽和の総和が反映される。したがって、TCS実験を理論的に記述するためには、全てのisotopomerについて2-2節で述べるように各プロトンの磁化の経時変化を計算し、2-3節で述べるようにアンサンプル平均 (個々のisotopomerの存在比率で重み付けした加重平均) を求める必要がある。

TCS法に用いるリガンド分子には重水素標識を行っているため、水素としてはアミド基水素など交換性水素しか存在しない。したがって、isotopomer毎に水素原子の双極子相互作用のネットワークが大きく異なる。一方、レセプター分子内には非交換性水素が高密度に存在するため、

isotopomer 毎の水素原子の双極子相互作用のネットワークの差異は小さい。したがって以降の議論では、レセプターの isotopomer は無視して、リガンドの isotopomer のみを考える。

次の二つの節 (2-2 および 2-3 節) では、与えられた実験条件において各 isotopomer の磁化を計算し、観測値である転移交差飽和をシミュレーションできることを理論的に示すが、それがどのような実験の意味をもつかに主な興味のある方々は、これらの節を読み飛ばしても、3章で述べるシミュレーションの結果に基づいた TCS 実験条件の最適化を理解することは可能である。

2-2. Isotopomer の磁化の経時変化

2-1 節で述べたように、TCS 実験を理論的に記述するためには、リガンドのプロトンの磁化の経時変化を各 isotopomer について記述する必要がある。以下では、2-2 節で、各 isotopomer における磁化の経時変化を理論的に記述した上で、観測されるシグナル強度比を 2-3 節で取り扱う。

リガンド分子に n 個の交換性水素部位があるとすると、リガンドの isotopomer は 2^n 通り存在する。このうち、全て ^2H に占有されている isotopomer を除いた $2^n - 1$ 通りの isotopomer を取り扱う。任意の k 番目の isotopomer の磁化の経時変化は式 (1) で表される。

$$\frac{d\mathbf{M}_k(t)}{dt} = -(\mathbf{R}_k + \mathbf{K}_k)(\mathbf{M}_k(t) - \mathbf{M}^0) + \mathbf{Q}_k \quad (1)$$

$\mathbf{M}_k(t)$ はリガンドプロトンおよびラジオ波を照射されていないレセプタープロトンの磁化から成るベクトル、 \mathbf{M}^0 は平衡磁化の大きさ M^0 からなるベクトル、 \mathbf{R}_k はリガンドプロトンの自己緩和速度定数およびリガンド分子内の交差緩和速度定数から成る行列、 \mathbf{K}_k は結合および解離速度定数から成る行列、 \mathbf{Q}_k はリガンドプロトンとラジオ波を照射されて飽和されているレセプタープロトンの間の交差緩和速度から成るベクトルであり、 t はラジオ波照射時間である。添え字の k は、 k 番目の isotopomer についての行列またはベクトルであることを示す。

式 (1) の行列およびベクトルは、解離状態のリガンド、解離状態のレセプター、結合状態のリガンド、結合状態のレセプターの要素で構成されており、式 (2) のように表される。

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \mathbf{M}_k^{\text{L}} \\ \mathbf{M}_k^{\text{R}} \\ \mathbf{M}_k^{\text{L}'} \\ \mathbf{M}_k^{\text{R}'} \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \mathbf{R}_k^{\text{L}} & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{R}_k^{\text{R}} & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{R}_k^{\text{L}'} \\ 0 & 0 & 0 & \mathbf{R}_k^{\text{R}'} \end{pmatrix}$$

$$+ \begin{pmatrix} k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} & 0 & -k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} & 0 \\ 0 & k_{\text{on}}[\text{L}]\mathbf{E} & 0 & -k_{\text{on}}[\text{L}]\mathbf{E} \\ -k_{\text{off}}\mathbf{E} & & & k_{\text{off}}\mathbf{E} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{M}_k^{\text{L}} - \mathbf{M}^0 \\ \mathbf{M}_k^{\text{R}} - \mathbf{M}^0 \\ \mathbf{M}_k^{\text{L}'} - \mathbf{M}^0 \\ \mathbf{M}_k^{\text{R}'} - \mathbf{M}^0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ \mathbf{Q}_k^{\text{R}} \\ \mathbf{Q}_k^{\text{L}'} \\ \mathbf{Q}_k^{\text{R}'} \end{pmatrix} \quad (2)$$

添え字の L は解離状態のリガンド、 R は解離状態のレセプター、 L' は結合状態のリガンド、 R' は結合状態のレセプターを表す。 k_{on} は二次の結合速度定数、 k_{off} は解離速度定数、 $[\text{L}]$ は解離状態のリガンドの濃度、 $[\text{R}]$ は解離状態のレセプターの濃度、 \mathbf{E} は単位行列である。

レセプターが巨大である場合、レセプター内の飽和の伝播速度が非常に大きいので、ラジオ波照射によってレセプター分子の全てのプロトンが瞬時に飽和されると仮定することができる。この仮定により、式 (2) は式 (3) のように簡略化される。

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \mathbf{M}_k^{\text{L}} \\ \mathbf{M}_k^{\text{L}'} \end{pmatrix} = - \left[\begin{pmatrix} \mathbf{R}_k^{\text{L}} & 0 \\ 0 & \mathbf{R}_k^{\text{L}'} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} & -k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} \\ -k_{\text{off}}\mathbf{E} & k_{\text{off}}\mathbf{E} \end{pmatrix} \right] \begin{pmatrix} \mathbf{M}_k^{\text{L}} - \mathbf{M}^0 \\ \mathbf{M}_k^{\text{L}'} - \mathbf{M}^0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 0 \\ \mathbf{Q}_k^{\text{L}'} \end{pmatrix} \quad (3)$$

式 (3) において、交換速度を表す行列 \mathbf{K}_k は、複合体を形成しているリガンドの割合 p_B と解離速度定数 k_{off} のみによって式 (4) のように表すことができる。

$$\mathbf{K}_k = \begin{pmatrix} k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} & -k_{\text{on}}[\text{R}]\mathbf{E} \\ -k_{\text{off}}\mathbf{E} & k_{\text{off}}\mathbf{E} \end{pmatrix} = k_{\text{off}} \begin{pmatrix} \frac{p_B}{1-p_B}\mathbf{E} & -\frac{p_B}{1-p_B}\mathbf{E} \\ -\mathbf{E} & \mathbf{E} \end{pmatrix} \quad (4)$$

リガンド分子の交換性プロトンサイトを n 個とし、 k 番目の isotopomer に含まれる ^1H 原子の数を n_k として ($n_k \leq n$)、 k 番目の isotopomer の ^1H 原子に 1, 2, 3, ..., n_k と番号をつけると、式 (3) の \mathbf{M}_k^{L} 、 $\mathbf{M}_k^{\text{L}'}$ 、 \mathbf{R}_k^{L} 、 $\mathbf{R}_k^{\text{L}'}$ 、 $\mathbf{Q}_k^{\text{L}'}$ は、式 (5)-(7) で表される。

$$\mathbf{M}_k^{\text{L}}(t) = \begin{pmatrix} M_1^{\text{L}(k)}(t) \\ \vdots \\ M_{n_k}^{\text{L}(k)}(t) \end{pmatrix}, \quad \mathbf{M}_k^{\text{L}'}(t) = \begin{pmatrix} M_1^{\text{L}'(k)}(t) \\ \vdots \\ M_{n_k}^{\text{L}'(k)}(t) \end{pmatrix} \quad (5)$$

$$\mathbf{R}_k^{\text{L}} = \begin{pmatrix} \rho_1^{\text{L}(k)} & \sigma_{1,2}^{\text{L}(k)} & \cdots & \sigma_{1,n_k}^{\text{L}(k)} \\ \sigma_{2,1}^{\text{L}(k)} & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \sigma_{n_k-1,n_k}^{\text{L}(k)} \\ \sigma_{n_k,1}^{\text{L}(k)} & \cdots & \sigma_{n_k,n_k-1}^{\text{L}(k)} & \rho_{n_k}^{\text{L}(k)} \end{pmatrix},$$

$$\mathbf{R}_k^{L'} = \begin{pmatrix} \rho_{1,1}^{L'(k)} & \sigma_{1,2}^{L'(k)} & \cdots & \sigma_{1,m}^{L'(k)} \\ \sigma_{2,1}^{L'(k)} & \ddots & & \vdots \\ \vdots & & \ddots & \sigma_{n-1,m}^{L'(k)} \\ \sigma_{n,1}^{L'(k)} & \cdots & \sigma_{n,n-1}^{L'(k)} & \rho_{n,n}^{L'(k)} \end{pmatrix} \quad (6)$$

$$\mathbf{Q}_k^{L'} = \begin{pmatrix} \sum_j^{\text{receptor}} \sigma_{1,j}^{L'(k)} M^0 \\ \vdots \\ \sum_j^{\text{receptor}} \sigma_{n,j}^{L'(k)} M^0 \end{pmatrix} \quad (7)$$

ここで、 $M_i^{L'(k)}$ 、 $M_i^{L'(k)}$ はそれぞれ解離状態および結合状態におけるリガンドの k 番目の isotopomer 中のプロトン i の縦磁化の大きさを表す。 $\rho_i^{L'(k)}$ 、 $\rho_i^{L'(k)}$ はそれぞれ解離状態および結合状態におけるリガンドの k 番目の isotopomer 中のプロトン i の自己緩和速度定数を表し、 $\sigma_{ij}^{L'(k)}$ 、 $\sigma_{ij}^{L'(k)}$ はそれぞれ解離状態および結合状態における k 番目の isotopomer 中のプロトン i とプロトン j の間の交差緩和速度定数を表す。 $\sum_j^{\text{receptor}} \sigma_{ij}^{L'(k)} M^0$ はリガンドの k 番目の isotopomer 中のプロトン i とレセプターの全てのプロトンの間の交差緩和速度の和を表す。

分子の回転相関時間が 10 ns 以上 (分子量が 25 kDa 以上に相当) の場合、 $\rho_i^{L'(k)}$ 、 $\rho_i^{L'(k)}$ 、 $\sigma_{ij}^{L'(k)}$ 、 $\sigma_{ij}^{L'(k)}$ は式(8-1)～(8-4)で表される。

$$\rho_i^{L'(k)} = d_{\text{HH}}^2 \cdot \tau_c^L \sum_{j=1, j \neq i}^{n_k} (r_{ij}^{(k)})^{-6} + R_1^{15\text{N}}(\tau_c^L) + R_1^{\text{CSA}}(\tau_c^L) \quad (8-1)$$

$$\rho_i^{L'(k)} = d_{\text{HH}}^2 \cdot \tau_c^L \left[\sum_{j=1, j \neq i}^{n_k} (r_{ij}^{(k)})^{-6} + \sum_j^{\text{receptor}} (r_{ij}^{(k)})^{-6} \right] + R_1^{15\text{N}}(\tau_c^L) + R_1^{\text{CSA}}(\tau_c^L) \quad (8-2)$$

$$\sigma_{ij}^{L'(k)} = -d_{\text{HH}}^2 \cdot \tau_c^L \cdot (r_{ij}^{(k)})^{-6} \quad (8-3)$$

$$\sigma_{ij}^{L'(k)} = -d_{\text{HH}}^2 \cdot \tau_c^L \cdot (r_{ij}^{(k)})^{-6} \quad (8-4)$$

ここで、 $r_{ij}^{(k)}$ はリガンドの k 番目の isotopomer 中のプロトン i とプロトン j の間の距離であり、 τ_c^L 、 τ_c^L はそれぞれ解離状態および結合状態におけるリガンド分子の回転相関時間である。また、 $d_{\text{HH}}^2 = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_{\text{H}}^4 \gamma_{\text{N}}^2}{10}$ であり、 μ_0 は真空の透磁率、 \hbar はプランク定数 h を 2π で割った値、 γ_{H} 、 γ_{N} はそれぞれ ^1H 、 ^{15}N の核磁気回転比である。

$R_1^{15\text{N}}(\tau_c)$ および $R_1^{\text{CSA}}(\tau_c)$ は、それぞれ ^1H と直接結合している ^{15}N との双極子-双極子相互作用および ^1H の化学シフトの異方性による ^1H の自己緩和速度への寄与であり、式(8-5)、(8-6)で表される。

$$R_1^{15\text{N}}(\tau_c) = d_{\text{HN}}^2 \cdot r_{\text{HN}}^{-6} \cdot \{6J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}}, \tau_c) + 3J(\omega_{\text{H}}, \tau_c) + J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}}, \tau_c)\} \quad (8-5)$$

$$R_1^{\text{CSA}}(\tau_c) = \frac{2}{15} \Delta\sigma_{\text{H}}^2 \omega_{\text{H}}^2 J(\omega_{\text{H}}, \tau_c) \quad (8-6)$$

r_{HN} はアミド基内 H-N の核間距離、 ω_{H} 、 ω_{N} はそれぞれ ^1H 、 ^{15}N の共鳴角周波数、 $\Delta\sigma_{\text{H}}$ はアミドプロトンの化学シ

フトの異方性の大きさである。また、 $d_{\text{HN}}^2 = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_{\text{H}}^2 \gamma_{\text{N}}^2}{10}$ であり、 $J(\omega, \tau_c)$ は式(8-7)で表される。

$$J(\omega, \tau_c) = \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \quad (8-7)$$

また、H-D 交換および分子内部の運動性が緩和に及ぼす影響は無視した。

ラジオ波照射開始時においてリガンドの全てのプロトンの磁化が平衡磁化である ($\mathbf{M}_k(0) = \mathbf{M}^0$) と仮定すると、式(3)の解は式(9)のように表される。

$$\mathbf{M}_k(t) = \mathbf{M}^0 + [\mathbf{E} - \exp\{-\mathbf{R}_k + \mathbf{K}_k\}t] (\mathbf{R}_k + \mathbf{K}_k)^{-1} \mathbf{Q}_k \quad (9)$$

($\mathbf{R}_k + \mathbf{K}_k$) を対角化することにより、式(9)によって個々の isotopomer の磁化の経時変化をシミュレーションすることが可能である。

2-3. 観測されるシグナル強度比

次に、個々の isotopomer の磁化のアンサンブル平均を算出することにより、観測されるシグナル強度を計算する。レセプターが巨大である場合、結合状態のシグナルは観測されないので、以下では解離状態のリガンドの磁化 $\mathbf{M}_i^L(t)$ のみを考える。

リガンドのプロトン i の磁化のアンサンブル平均 $\langle M_i^L(t) \rangle$ は、プロトン i を含む全ての isotopomer について、プロトン i の磁化をその isotopomer の存在比率で重み付けした加重平均であり、式(10)で表される。

$$\langle M_i^L(t) \rangle = \sum_k^{\text{isotopomers containing the } i\text{th proton}} p_k M_i^{L(k)}(t) \quad (10)$$

$M_i^{L(k)}(t)$ はリガンドの k 番目の isotopomer 中のプロトン i の縦磁化の大きさであり (2-2 節で、個々の isotopomer の磁化を計算する上でプロトン i に付けた番号は、個々の isotopomer ごとに異なっているので、 i に * を付加している)、 p_k はリガンドの k 番目の isotopomer の存在比率である。溶媒中の H_2O の存在比率を $p_{\text{H}_2\text{O}}$ とすると p_k は式(11)で表される。

$$p_k = p_{\text{H}_2\text{O}}^n \cdot (1 - p_{\text{H}_2\text{O}})^{n-k} \quad (11)$$

リガンドのプロトン i の NMR シグナル強度 $I_i(t)$ は、 $\langle M_i^L(t) \rangle$ に比例する。

$$I_i(t) = \alpha_i \langle M_i^L(t) \rangle \quad (12)$$

α_i はプロトン i の磁化の大きさとシグナル強度を関連付ける比例係数である。

一方、ラジオ波照射を行わないで測定したスペクトルにおける、プロトン i のシグナル強度 $I_i(0)$ は式(13)で表される。

$$I_i(0) = \alpha_i \cdot p_{\text{H}_2\text{O}} M^0 \quad (13)$$

式(12)、(13)より、リガンドのプロトン i のシグナル強度

比 (intensity ratio) は, 式(14)で表される.

$$\frac{I_i(t)}{I_i(0)} = \frac{\langle M_i^+(t) \rangle}{p_{\text{H}_2\text{O}} M^0} \quad (14)$$

式(14)により, TCS 実験で観測されるシグナル強度比を, ラジオ波照射時間 (t), リガンドおよび複合体に関するパラメータ (水素原子の空間的配置, 回転相関時間 τ_c^+ , τ_c^-), 結合・解離平衡に関するパラメータ (p_B , k_{off}), 溶媒の H_2O 濃度 ($p_{\text{H}_2\text{O}}$) によりシミュレーションすることができる.

3. モデルスピン系を用いた TCS 実験条件の影響の検証

2-2 節および 2-3 節では, isotopomer の磁化の経時変化およびそのアンサンブル平均を理論的に記述することにより, TCS 実験をシミュレーションすることを可能とした. 3 章では, 確立した方法に基づいて, 各パラメータが TCS 実験にどのような影響を与えるのかをシミュレーションにより調べた結果を述べる. 各パラメータが及ぼす影響を分かりやすくするために, シミュレーションにはリガンド・レセプター相互作用系を模したモデルスピン系を用いた.

3-1. モデルスピン系

モデルスピン系の基本構造を図 2(A) に示す. リガンドは直線上に 3\AA の間隔で配置された 3 個の交換性プロトン L1, L2, L3 で構成した. 一方, レセプターは, 立方体内の 3\AA 間隔の格子点に配置された非交換性プロトンで構成し, その一辺のプロトン数は 13 個とした. 図 2(B) に示すように, 一辺のプロトン数が 13 個以上では各リガンドプロトンと全レセプタープロトンとの距離の -6 乗の総和 (Σr^{-6}) がほぼ一定なので, これ以上プロトンを増やしても TCS 実験には影響しない. 分子間距離は 5\AA とした. リガンド, レセプターの回転相関時間は, 特に記述がない場合はそれぞれ 10 ns, 100 ns (分子量 25 kDa, 250 kDa に

相当する) とした. L1 プロトンが結合界面に相当するので, L2, L3 に比べてより大きなシグナル強度減少が L1 に観測される条件が, より適切な TCS 実験条件である.

3-2. 溶媒の H_2O 濃度の影響

TCS 法では, リガンド分子内のプロトン密度を低下させるために溶媒の H_2O 濃度を低くする必要がある. しかし, H_2O 濃度が低くなるとアミド基由来のシグナル強度が減少し, それに伴い観測感度も低下するため, 適切な H_2O 濃度を明らかにすることは重要である. 溶媒の H_2O 濃度を 10% から 90% まで変えた時の, モデルスピン系におけるシグナル強度比のシミュレーション結果を図 3 に示す.

H_2O 濃度が 10% の条件では, L2, L3 に比べて L1 のシグナル強度比が顕著に減少するが, H_2O 濃度が上昇すると, L1 のシグナル強度比が上昇すると共に L3 のシグナル強度比が減少し, 90% の条件では L1, L2, L3 は同程度のシグナル強度比になる. これは, H_2O 濃度が上昇すると, L2, L3 も強く飽和を受けているプロトン密度の高い isotopomer の存在比率が大きくなって, 観測される磁化への寄与が大きくなるためである. このシミュレーションの結果より, TCS 実験の H_2O 濃度は 10%~30% が望ましいことが分かる.

3-3. リガンドの結合飽和度 p_B および解離速度定数 k_{off} の影響

結合・解離平衡はリガンド総濃度 L_T , レセプター総濃度 R_T , 結合速度定数 k_{on} , 解離速度定数 k_{off} で規定されるが, TCS 実験の場合は, 式(4)で示すように, リガンド結合飽和度 p_B と解離速度定数 k_{off} のみを考えればよい.

最初に, p_B を調節する方法を考える. p_B は, 実験的にはリガンド総濃度 L_T , レセプター総濃度 R_T , 解離定数 K_D で決まるパラメータである. L_T , R_T , K_D と p_B の関係を図

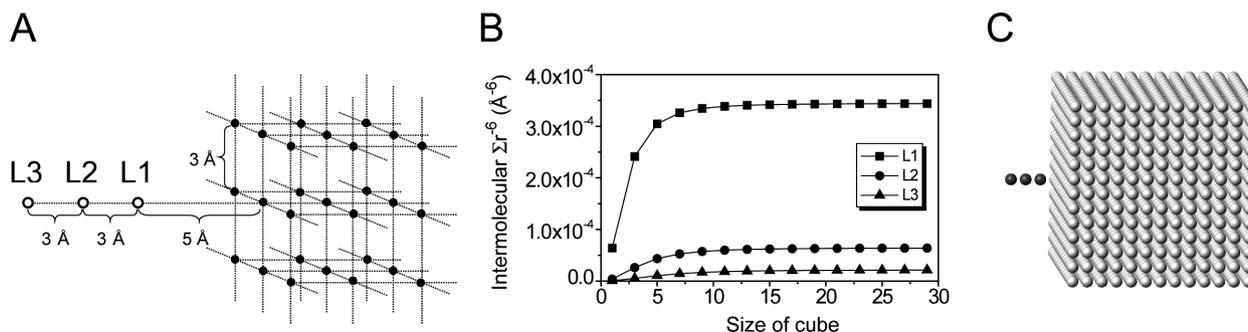


図 2 シミュレーションに用いるモデルスピン系

(A) モデルスピン系の基本構造. リガンドは 3 個の交換性プロトン L1, L2, L3 (白丸) から成り, 直線状に 3\AA 間隔で配置されている. レセプターは非交換性プロトン (黒丸) から成り, 立方体状に 3\AA 間隔で配置されている. レセプターと L1 プロトンの間隔は 5\AA である.

(B) レセプターの一辺のプロトン数と, リガンドプロトンの分子間 Σr^{-6} の関係

(C) シミュレーションに用いたモデルスピン系の CPK モデルを示す. レセプターの一辺のプロトン数は 13 個である.

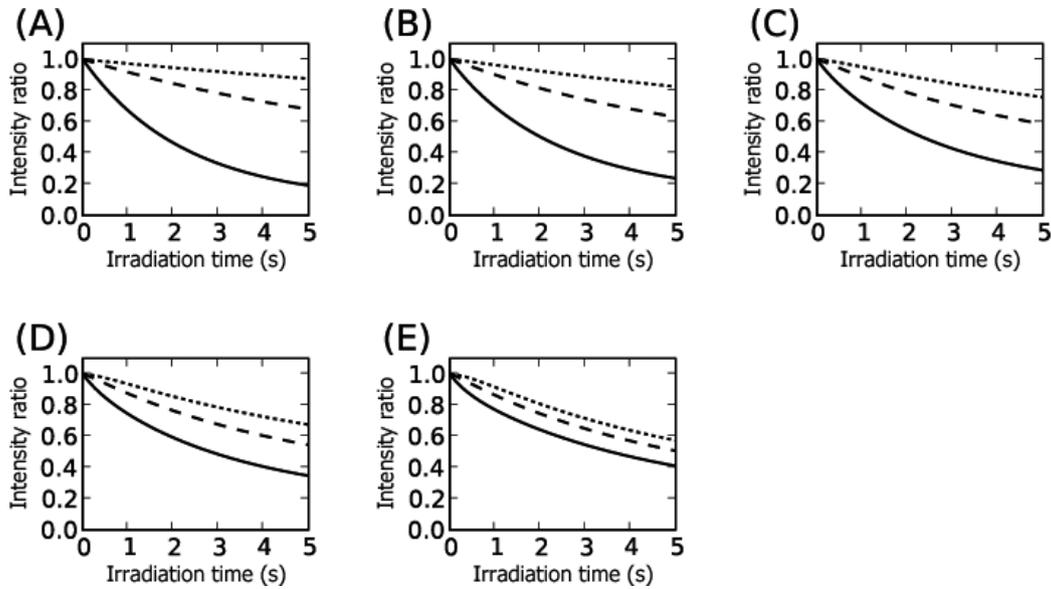


図3 溶媒のH₂O濃度とシグナル強度比の関係

$p_B = 0.2$, $k_{off} = 100$ (s⁻¹), $\tau_{c, ligand} = 10$ (ns), $\tau_{c, receptor} = 100$ (ns) で計算した, シグナル強度比のラジオ波照射時間依存性を示す. 図中の実線, 破線, 点線はそれぞれL1, L2, L3のシグナル強度比を表す.

(A) 10% H₂O, (B) 30% H₂O, (C) 50% H₂O, (D) 70% H₂O, (E) 90% H₂O

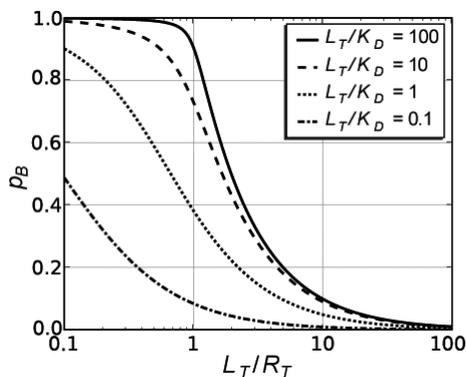


図4 リガンド総濃度 (L_T), レセプター総濃度 (R_T), 解離定数 (K_D) とリガンド結合飽和度 (p_B) の関係

4に示す. $p_B = 0.1$ を達成するためには, $L_T/K_D \geq 10$, すなわち, リガンド濃度が K_D よりも十分大きい場合は, $L_T/R_T = 10$, すなわち, リガンドに対して1/10倍量のレセプターを添加すればよく, $L_T/K_D = 1$ の場合は $L_T/R_T = 5$ であればよい. 一方, $L_T/K_D = 0.1$ の場合は $p_B = 0.1$ を達成するためには $L_T/R_T < 1$ でなければならない.

次に, 図5に様々な p_B , k_{off} で計算したシグナル強度比を示す. いずれの k_{off} でも $p_B = 0.01$ では5 secのラジオ波照射時間内にはリガンドに転移した飽和がほとんど観測されないが, p_B が大きくなるほど飽和効率が上昇する. また, $k_{off} \geq 10$ (s⁻¹)の場合は, $p_B \geq 0.1$ であれば十分な飽和を観測できるが, $k_{off} = 1$ (s⁻¹)の場合は $p_B > 0.1$ でなければ十分な飽和を観測することができず, $k_{off} = 0.1$ (s⁻¹)の場合は $p_B = 0.5$ でも十分な飽和は観測されない.

飽和効率が p_B , k_{off} に依存して変化する理由を理解するために, リガンドが単位時間当たり結合状態にある平均時間を考える. リガンドが解離状態である平均時間 τ_{free} , 結合状態である平均時間 τ_{bound} はそれぞれ式(15-1), (15-2)で表される.

$$\tau_{free} = \frac{1}{k_{on}[R]} = \frac{1-p_B}{p_B k_{off}} \quad (15-1)$$

$$\tau_{bound} = \frac{1}{k_{off}} \quad (15-2)$$

リガンド分子が解離状態を経て複合体を形成し, 再び解離状態に戻るまでの過程を「ターンオーバー」と呼ぶことにすると, 平均ターンオーバー時間 $\tau_{turnover}$ はこれらの時間の和で与えられ, 1 sec間の平均ターンオーバー回数 $N_{turnover}$ は $\tau_{turnover}$ の逆数で与えられる.

$$N_{turnover} = \frac{1}{\tau_{turnover}} = \frac{1}{\tau_{free} + \tau_{bound}} = p_B k_{off} \quad (16)$$

一方, リガンドが実際に飽和を受けるのは結合状態にある間なので, 1秒間の平均結合状態滞在時間 (T_{bound}) は p_B であることから, 飽和効率は p_B に比例することが分かる. 次に, $N_{turnover}$ を図5の $p_B = 0.1$ の各 k_{off} について求めると, (B) 100, (E) 10, (H) 1, (K) 0.1, (N) 0.01になる. $N_{turnover}$ は1 sec間にリガンドがターンオーバーする平均回数であり, $N < 1$ の $N = 0.1, 0.01$ では数秒のラジオ波照射時間内に一部のリガンド分子が飽和を受けられなくなる.

以上は全リガンドの結合状態滞在時間の平均値についての議論であったが, 次に, 個々のリガンド分子が結合状態を経験する時間の分布を考える. 以降では, リガンドの結

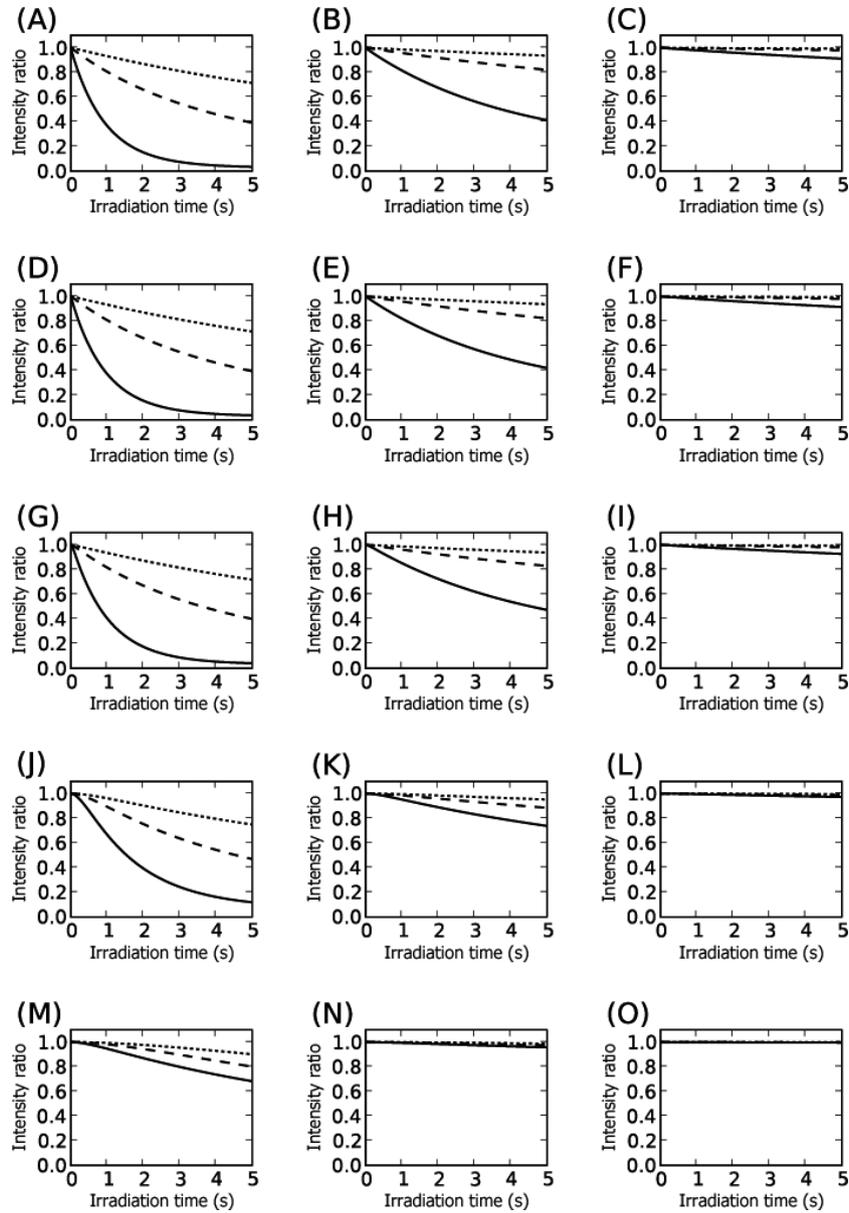


図5 リガンド結合飽和度 (p_B) および解離速度定数 (k_{off}) とシグナル強度比の関係 $\tau_{c,ligand}=10$ (ns), $\tau_{c,receptor}=100$ (ns), 10% H_2O で計算した, シグナル強度比のラジオ波照射時間依存性を示す. 図中の実線, 破線, 点線はそれぞれ L1, L2, L3 のシグナル強度比を表す.

- (A)-(C) $k_{off}=1000$ (s^{-1}), (A) $p_B=0.5$, (B) $p_B=0.1$, (C) $p_B=0.01$
- (D)-(F) $k_{off}=100$ (s^{-1}), (D) $p_B=0.5$, (E) $p_B=0.1$, (F) $p_B=0.01$
- (G)-(I) $k_{off}=10$ (s^{-1}), (G) $p_B=0.5$, (H) $p_B=0.1$, (I) $p_B=0.01$
- (J)-(L) $k_{off}=1$ (s^{-1}), (J) $p_B=0.5$, (K) $p_B=0.1$, (L) $p_B=0.01$
- (M)-(O) $k_{off}=0.1$ (s^{-1}), (M) $p_B=0.5$, (N) $p_B=0.1$, (O) $p_B=0.01$

合状態滞在時間を, 「ラジオ波照射時間」に対してリガンドが実際に飽和を受ける時間という意味で「実効的飽和時間 (effective saturation time)」と呼ぶことにする.

図6に, 実効的飽和時間を求めるシミュレーションプロトコルを示す. 結合・解離平衡を規定するパラメータ (L_T , R_T , k_{on} , k_{off}) を入力情報とし, 10000個の擬似リガンド分子について結合・解離現象を確率的に発生させることによ

り, 個々の擬似リガンド分子の実効的飽和時間を計測した. 図7に, $k_{off}=100$ (s^{-1})における擬似リガンド分子の実効的飽和時間の分布と TCS 実験のシグナル強度比のシミュレーション結果を示す. 図7より, $p_B=0.5$ および $p_B=0.1$ では実効的飽和時間は $p_B \cdot T_{irrad}$ を中心に分布しており, 式(18)の単位時間当たりの平均結合状態滞在時間が p_B であることと合致している. また, $p_B=0.01$ では, 1

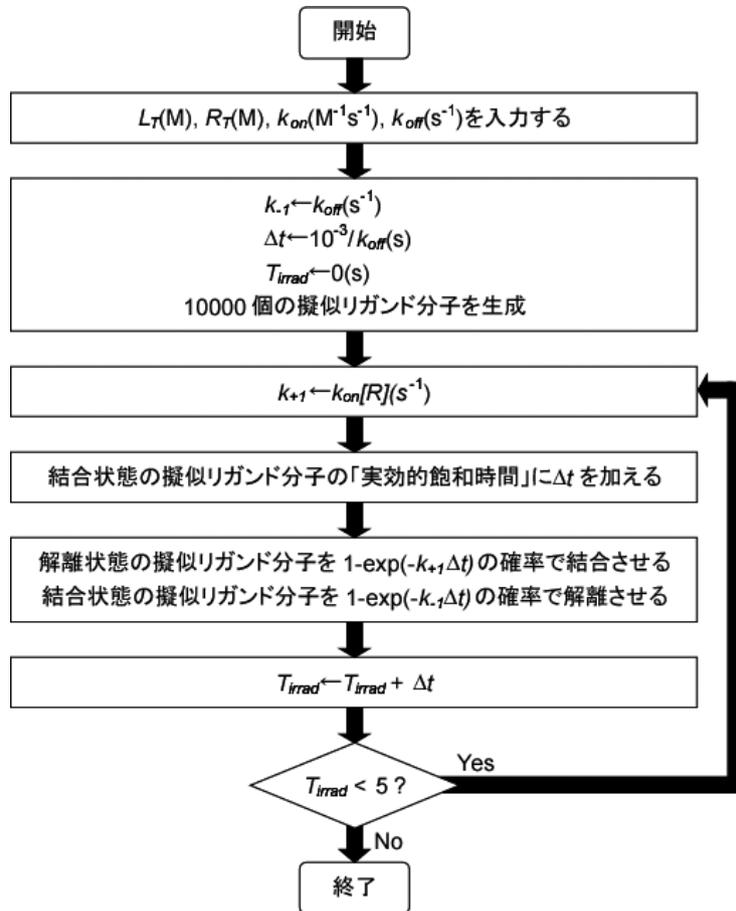


図6 実効的飽和時間 (effective saturation time) の分布を求めるシミュレーションプロトコル

sec, 3 sec のラジオ波照射時間後に実効的飽和時間が 0 sec のリガンド分子がそれぞれ 38%, 5.6% 存在している. 実効的飽和時間が 0 sec であるということは, これらのリガンド分子がラジオ波照射時間内に一度もレセプターと結合していないことを示しており, これらのリガンド分子は飽和を受けないまま観測されるため, TCS 実験で観測される飽和を「希釈」することになる.

3-4. レセプターの分子量の影響

TCS 法は巨大なレセプターの系にも適用できることが特徴である. しかし, 複合体の分子量が大きくなると複合体の回転相関時間が長くなり, 交差緩和速度が上昇する. この影響を調べるため, レセプターの回転相関時間 $\tau_{c, receptor}$ を 10 ns, 100 ns, 1000 ns (それぞれ分子量が 25 kDa, 250 kDa, 2500 kDa に相当する) としてシグナル強度比を計算した (図 8).

図 8 に示すように, $\tau_{c, receptor}$ が大きくなると交差緩和速度が上昇するため, 飽和効率が上昇する. $\tau_{c, receptor} = 100$ (ns) では $p_B = 0.5$ および $p_B = 0.1$ で十分な飽和が観測されるが, $\tau_{c, receptor} = 10$ (ns) では飽和効率が低くなるため $p_B = 0.1$ では

十分な飽和が観測できない. また, $\tau_{c, receptor} = 1000$ (ns) では飽和効率が非常に高くなるため, $p_B = 0.5$ で 500 msec より短いラジオ波照射時間を用いるか, $p_B = 0.1$ または $p_B = 0.01$ で実験を行うことが望ましい. $\tau_{c, receptor} = 100$ (ns) では飽和が観測されなかった $p_B = 0.01$ で飽和が観測されるのは, $\tau_{c, receptor} = 1000$ (ns) では飽和効率が非常に高いためである.

以上の結果より, TCS 法はレセプターの回転相関時間が 10 ns ~ 1000 ns (分子量が 25 kDa ~ 2500 kDa 程度) の範囲で適用可能であることが分かる. ただし, レセプターの分子量が大きくなると, 実験に最適な p_B は小さくなることに留意する必要がある.

4. シミュレーションに基づく, 光合成明反応電子移動タンパク質間相互作用の TCS 解析

以上の定式化およびシミュレーション法の確立により, 最適な TCS 実験条件を見積もることが可能となった. 以下では, 巨大膜タンパク質複合体の TCS 実験を, シミュレーションにより見積もった実験条件下で実際に行い, 相互作用様式を解明した例を示す.

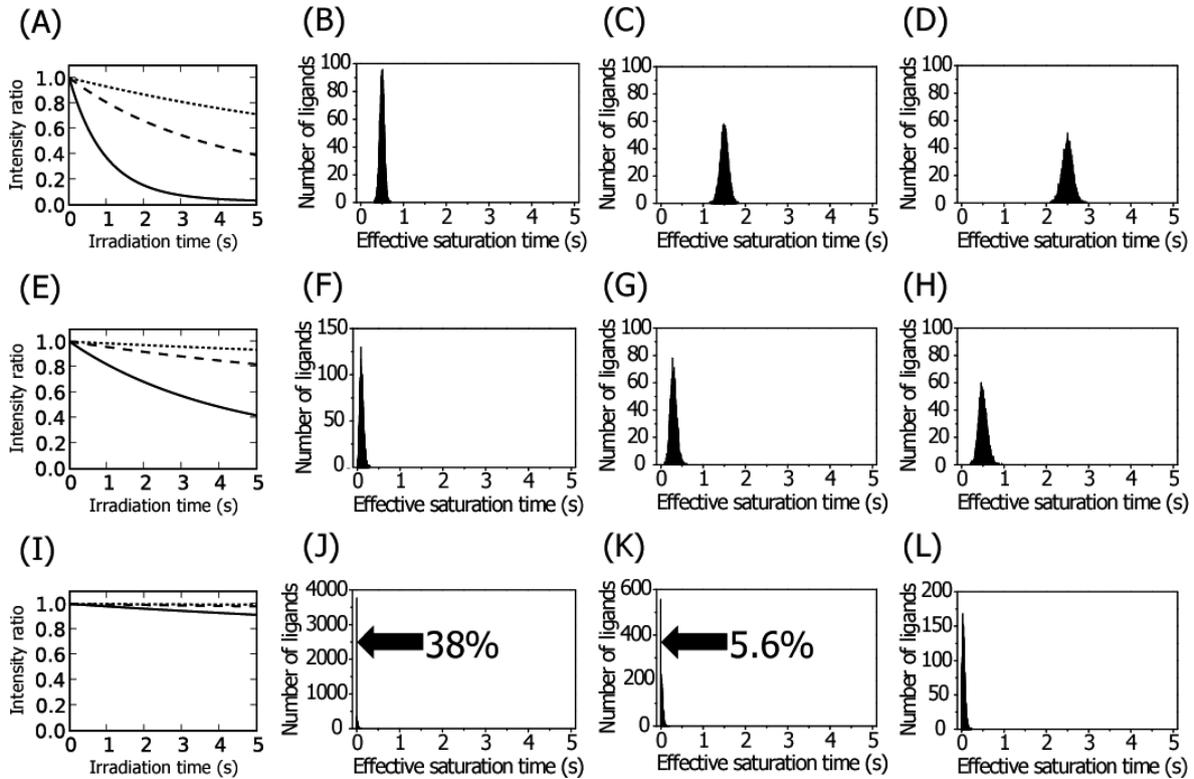


図7 リガンド結合飽和度 (p_B) と実効的飽和時間 (effective saturation time) の関係

p_B が 0.5 (B-D), 0.1 (F-H), 0.01 (J-L), ラジオ波照射時間が 1 秒 (B, F, J), 3 秒 (C, G, K), 5 秒 (D, H, L) の時の, $k_{off} = 100 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ の条件における実効的飽和時間を, 10000 個の擬似リガンド分子について計算した結果のヒストグラムを示す. 図中の矢印は実効的飽和時間が 0 sec のリガンドの割合を示す. A, E, I には, p_B がそれぞれ 0.5, 0.1, 0.01 の時の, シグナル強度比のラジオ波照射依存性を示した.

(A)-(D) $p_B = 0.5$, (E)-(H) $p_B = 0.1$, (I)-(L) $p_B = 0.01$,

(A), (E), (I) シグナル強度比 ($\tau_{c, \text{ligand}} = 10 \text{ (ns)}$, $\tau_{c, \text{receptor}} = 100 \text{ (ns)}$, 10% H_2O)

(B), (F), (J) $T_{\text{irrad}} = 1 \text{ (s)}$, (C), (G), (K) $T_{\text{irrad}} = 3 \text{ (s)}$, (D), (H), (L) $T_{\text{irrad}} = 5 \text{ (s)}$

植物のチラコイド膜で行われる光合成明反応は, 光エネルギーを ATP や NADPH の化学エネルギーに変換する, 生命にとって必須の反応である. プラスチシアニン (Pc) により, シトクロム b_6f から光化学系 I に電子が受け渡される電子輸送反応は, 光合成明反応の一部を担っている. 植物が光エネルギーを効率よく利用するためには, Pc が, シトクロム b_6f ならびに光化学系 I との結合, 電子移動, 解離を素早く繰り返すことにより, 効率よく電子を輸送する必要がある. (本項では, 結合, 電子移動, 解離を繰り返すことをまとめて電子輸送とよぶ.)

Pc は, 銅イオンをもつ, 分子量一万の可溶性タンパク質である. 一方, シトクロム b_6f ならびに光化学系 I は, 複数のポリペプチド鎖, 色素および補酵素からなる, それぞれ分子量約 20 万, 50 万の膜タンパク質複合体である.

これまでに, Pc の変異体解析により, Pc 上の銅イオン結合部位近傍に存在する疎水性残基に富んだ領域 (hydrophobic patch) に加えて, 酸性残基に富んだ領域 (acidic patch) 上の残基が, 電子輸送に重要であることが示されていた¹⁵⁾. また, 化学シフト変化および擬コンタクトシフ

トを指標とした NMR 解析に基づいて, シトクロム b_6f の Pc 結合ドメインであるシトクロム f と Pc の複合体モデルが提唱されていた^{16,17)}. このモデルでは, Pc の acidic patch 上の残基が, シトクロム f の正電荷に富んだ領域に近接して相互作用していた. しかし, シダ植物と高等植物の Pc は, 負電荷に富んだ残基のクラスターが, 大きく異なる場所に存在するにもかかわらず, 同等の光化学系 I との電子輸送活性をもつことが示されていた¹⁸⁾. この結果は, Pc の acidic patch がシトクロム b_6f や光化学系 I と近接して相互作用するような複合体モデルでは説明できない. そこで我々は, TCS 法を用いて Pc と光化学系 I およびシトクロム b_6f の相互作用様式を解明することにより, 効率よく電子を輸送する機構を解明することを目指した.

最初に, 先述のモデルスピンをを用いたシミュレーションを行い, 最適な TCS 実験条件を見積もった. 光化学系 I およびシトクロム b_6f は, それぞれ分子量約 50 万, 20 万の膜タンパク質複合体である. そのため, 界面活性剤により可溶化した光化学系 I およびシトクロム b_6f の回転相関時間は, 100~500 ns 程度と見積もられる. また, 分光学

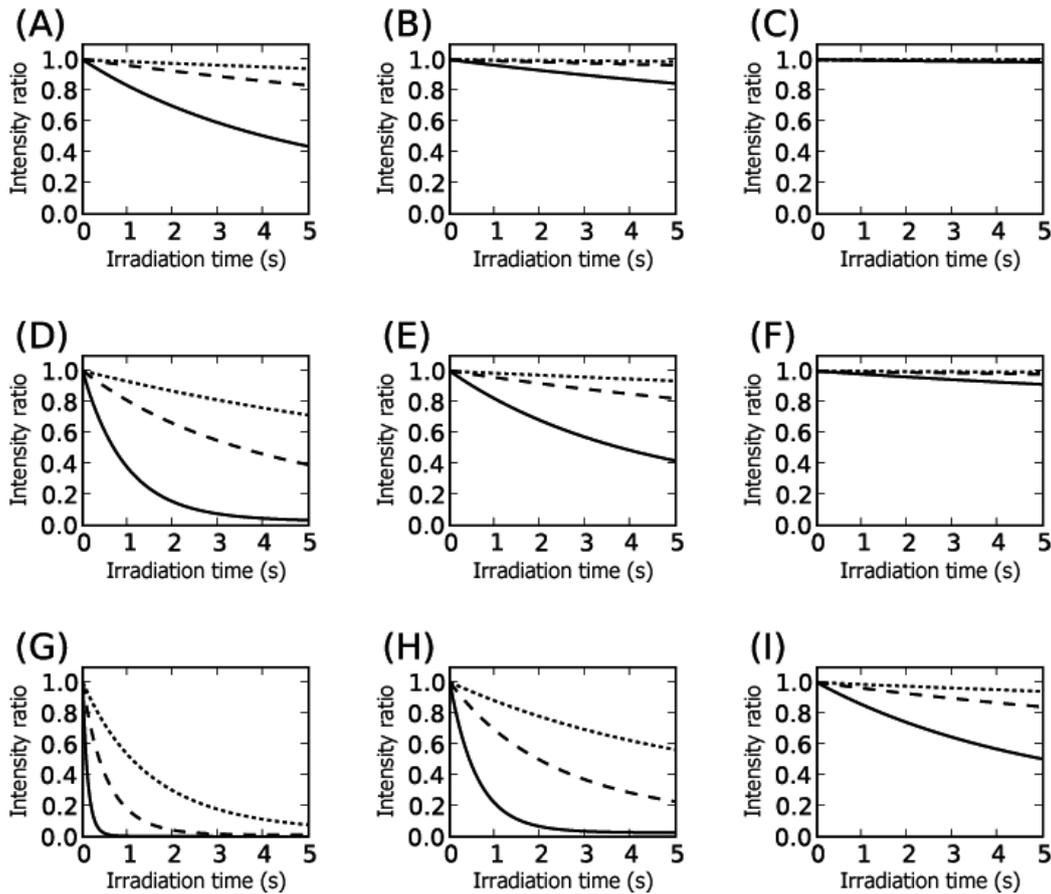


図8 リガンド結合飽和度 (p_B) およびレセプターの回転相関時間 ($\tau_{c, receptor}$) とシグナル強度比 (intensity ratio) の関係

$k_{off} = 100 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $\tau_{c, ligand} = 10 \text{ (ns)}$, 10% H_2O で計算した, シグナル強度比のラジオ波照射時間依存性を示す. 図中の実線, 破線, 点線はそれぞれ L1, L2, L3 のシグナル強度比を表す.

(A)–(C) $\tau_{c, receptor} = 10 \text{ (ns)}$, (A) $p_B = 0.5$, (B) $p_B = 0.1$, (C) $p_B = 0.01$

(D)–(F) $\tau_{c, receptor} = 100 \text{ (ns)}$, (D) $p_B = 0.5$, (E) $p_B = 0.1$, (F) $p_B = 0.01$

(G)–(I) $\tau_{c, receptor} = 1000 \text{ (ns)}$, (G) $p_B = 0.5$, (H) $p_B = 0.1$, (I) $p_B = 0.01$

的解析に基づいて, Pc と光化学系 I およびシトクロム b_{6f} の解離速度定数は, 10^3 s^{-1} 程度であることが示されている. 以上の実験条件の下で, 図に示したモデルスピ系における TCS 実験のシミュレーションを行った結果を図 9 に示す. この結果から, p_B が 0.1 程度であれば, 結合界面を決定することが可能であることが示唆された. そこで, 以下の TCS 実験では, p_B が 0.05~0.2 となるように, Pc と光化学系 I もしくはシトクロム b_{6f} の濃度を調整することとした.

次に, 界面活性剤で可溶化した光化学系 I と均一- $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 標識を施した Pc を混合したサンプル, ならびに界面活性剤で可溶化したシトクロム b_{6f} と均一- $[^2\text{H}, ^{15}\text{N}]$ 標識を施した Pc を混合したサンプルを調製して, TCS 実験を行った. ラジオ波照射に伴って, 有意な強度減少を示した残基を Pc の立体構造上へマッピングした結果を図 10 に示す. いずれの実験においても, ラジオ波照射にともない有意に強度減少を示した残基は, hydrophobic patch 上に連続して

いた. 一方, acidic patch 上の残基には, 有意な強度減少は観測されなかった. 界面活性剤との非特異的相互作用の影響を調べるために, Pc に界面活性剤のみを混合して, TCS 実験を行った場合は, 20% を超える有意な強度減少は観測されなかった.

acidic patch 上の残基に強度減少が観測されなかった理由として, 界面活性剤による可溶化に伴い, acidic patch と相互作用するサブユニットが脱落した可能性が考えられた. そこで, チラコイド膜から, 光化学系 I およびシトクロム b_{6f} の Pc 結合部位が外側を向いたベシクル (inside-out ベシクル) を作製して, Pc との TCS 実験を行った. その結果を図 11 に示す. 界面活性剤で可溶化した光化学系 I およびシトクロム b_{6f} を用いた時と同様に, 有意な強度減少を示した残基は hydrophobic patch 上で連続していた一方, acidic patch 上の残基には有意な強度減少は観測されなかった. チラコイド膜上の他のタンパク質および脂質との非特異的相互作用の影響を調べるために, 光化学系 I お

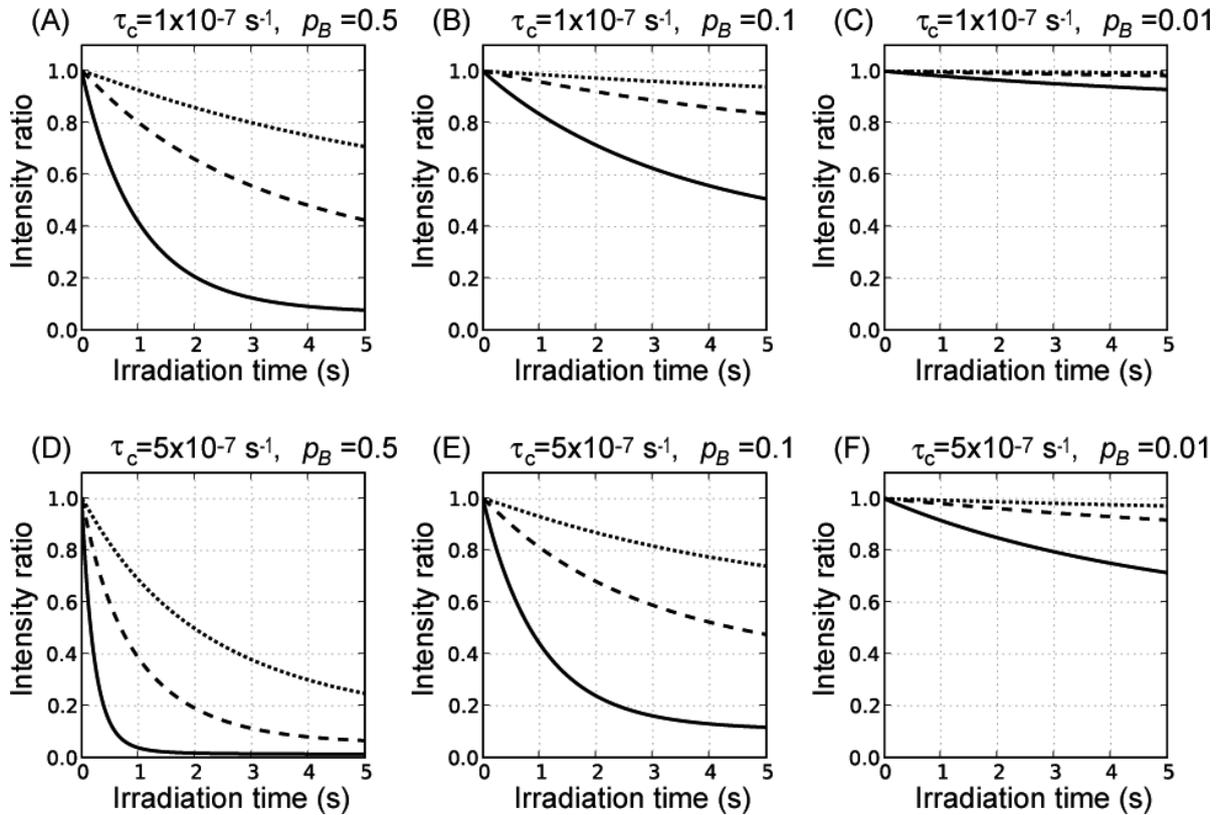


図9 光化学系Iおよびシトクロム b_6f の分子量に相当するレセプターの回転相関時間 ($\tau_{c, \text{receptor}}$) および解離速度定数の条件下における、リガンド結合飽和度 (p_B) とモデルスピンス系におけるシグナル強度比 (intensity ratio) の関係 $k_{\text{off}} = 1000 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, $\tau_{c, \text{ligand}} = 4 \text{ (ns)}$, 20% H_2O で計算した, シグナル強度比のラジオ波照射時間依存性を示す. 図中の実線, 破線, 点線はそれぞれ L1, L2, L3 のシグナル強度比を表す.

(A)–(C) $\tau_{c, \text{receptor}} = 100 \text{ (ns)}$, (A) $p_B = 0.5$, (B) $p_B = 0.1$, (C) $p_B = 0.01$
 (D)–(F) $\tau_{c, \text{receptor}} = 500 \text{ (ns)}$, (D) $p_B = 0.5$, (E) $p_B = 0.1$, (F) $p_B = 0.01$

よびシトクロム b_6f の Pc 結合部位が内側を向いたベシクル (right side-out ベシクル) を用いて TCS 実験を行った場合は, inside-out ベシクルを用いた時と比較して, 強度減少率は顕著に低かった. 以上の結果から, acidic patch 上の残基に強度減少が観測されないのは, 光化学系 I およびシトクロム b_6f のサブユニットの脱落が原因ではないことが示された.

以上の Pc と光化学系 I およびシトクロム b_6f の TCS 実験に基づいて, 最終的に形成される Pc と光化学系 I およびシトクロム b_6f との複合体では, acidic patch 上の残基は, 光化学系 I およびシトクロム b_6f と十分近接していないと結論した. 一方, acidic patch 上の残基に変異を導入すると, 光化学系 I およびシトクロム b_6f との電子輸送活性が低下することが報告されている. acidic patch 上の残基が, 遭遇複合体の形成に重要であると仮定すると, これらの結果を同時に説明することが可能である. 遭遇複合体とは, 最終的な複合体が形成される前段階として形成される, 静電相互作用により, 両者が緩く近接したような, 不均一な状態であり, 複合体の形成速度を上昇させるはたらきのあるものである. Pc と光化学系 I およびシトクロム

b_6f を含む, 多くの電子輸送タンパク質間の相互作用において, 遭遇複合体の存在により素早く複合体を形成する結果, 高い回転効率で電子輸送反応を行うことが提唱されている^{16,19}. Pc の acidic patch 上の残基は, 遭遇複合体を介して素早く複合体を形成するのに重要であるが, 最終的に形成される複合体の安定化への寄与は小さいと考え, acidic patch 上の残基への変異導入により電子輸送活性が低下するのは, 遭遇複合体の形成が阻害される結果, 複合体形成速度が低下するためであると説明でき, TCS 実験で強度減少が観測されないのは, TCS では存在割合の高い最終複合体のみが検出されているためであると説明できる.

また, 遭遇複合体では, Pc と光化学系 I およびシトクロム b_6f は, 密接な相互作用を形成しておらず, 配向も均一でないと考えられる. これにより, Pc 分子上の acidic patch の位置が変動しても, 遭遇複合体の形成に大きくは影響しないと考えられる. したがって, 酸性残基クラスターの位置が大きく異なる, シダ植物と高等植物由来の Pc が同等の電子輸送活性をもつことも説明できる.

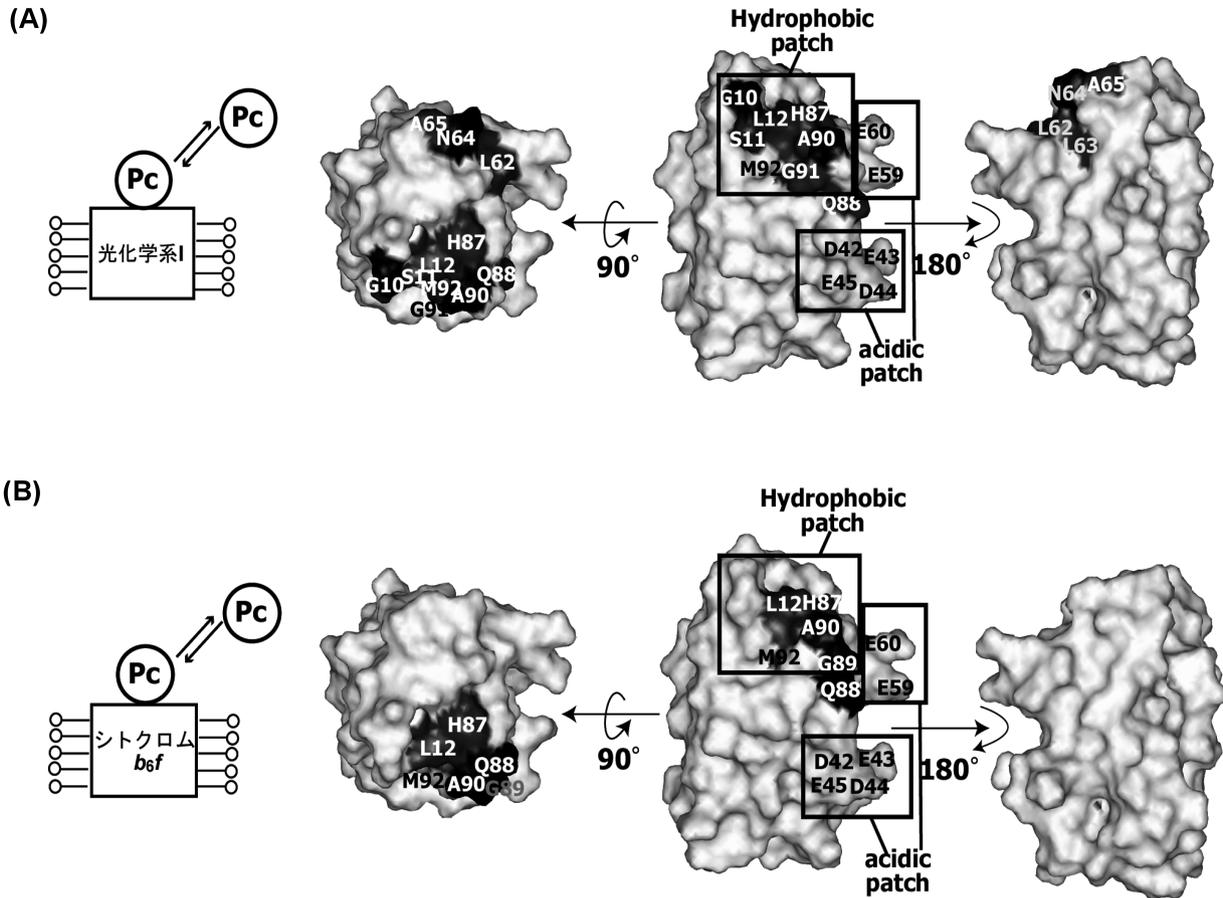


図10 TCS法により決定した、Pc上の、可溶性光化学系I (A) およびシトクロム b_{6f} (B) との結合界面。可溶性光化学系Iおよびシトクロム b_{6f} を用いたTCS実験で、有意な強度減少が観測された残基をマッピングした。Pcの変異体解析に基づいて、電子輸送に重要であることが示されている hydrophobic patch および acidic patch の領域を四角で示した。

5. 結 論

本研究では、TCS実験を定式化した上で、モデルスピリン系に対するシミュレーションを行って、実験条件が結果に与える影響を調べた。その結論は、以下のようにまとめられる。

- ・結合界面を同定するためには、 $^1\text{H}_2\text{O}$ 濃度が低い条件で実験を行う必要がある。
- ・高い飽和効率を達成するためには、 p_B が高い条件で実験を行う必要がある。
- ・ k_{off} が 0.1 s^{-1} より大きければ、TCS法を適用することが可能である。
- ・ k_{off} が 10 s^{-1} より大きい時は、 p_B は0.1以上とすることが望ましい。
- ・ k_{off} が 1 s^{-1} 前後の時は、 p_B は0.5程度とすることが望ましい。
- ・回転相関時間が $1\text{ }\mu\text{s}$ 程度となるような巨大な複合体の場合、 p_B が0.01程度でも結合界面を決定することが可能である。

また、本研究でTCS実験を定式化したことにより、TCS実験の結果を分子間距離の情報として定量的に利用することも期待される。

さらに、シミュレーションに基づいた実験条件下でTCS実験を行うことにより、プラストシアニン上の光化学系Iおよびシトクロム b_{6f} 上の結合界面を同定することに成功した。この結果に基づいて、Pcのacidic patch上の残基は、最終的な複合体の安定化への寄与は小さいが、遭遇複合体の形成を促進することにより、複合体を素早く形成する上で重要であることを提唱した。

本研究の成果に基づいて、様々な膜インターフェイスにおける、結合-解離を繰り返すような巨大タンパク質複合体の機能が、転移交差飽和法により解明されることが期待される。

文 献

- 1) Reibarkh, M., Malia, T.J., Hopkins, B.T., & Wagner, G. (2006) *J Biomol. NMR*, 36, 1-11.

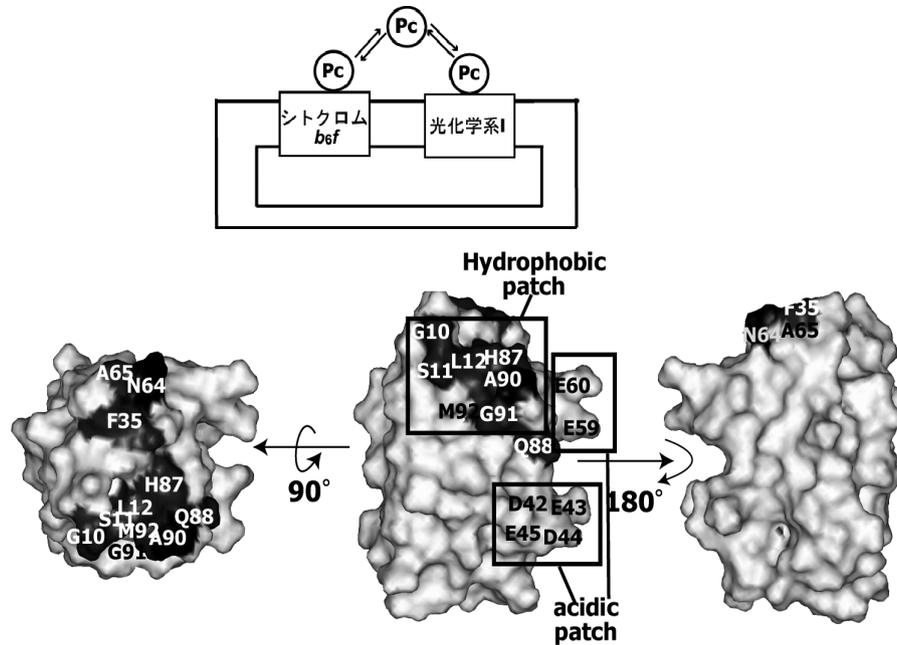


図 11 TCS 法により決定した, Pc 上の, チラコイド膜ベシクル中の光化学系 I もしくは シトクロム b_6f との結合界面

可溶化した光化学系 I およびシトクロム b_6f を用いた TCS 実験で, 有意な強度減少が観測された残基をマッピングした. Pc の変異体解析に基づいて, 電子輸送に重要であることが示されている hydrophobic patch および acidic patch の領域を四角で示した.

- 2) Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006) *Nature*, 443, 651–657.
- 3) van der Merwe, P.A. & Davis, S.J. (2003) *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 659–684.
- 4) Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H., & Shimada, I. (2002) *J. Mol. Biol.*, 318, 245–249.
- 5) Shimada, I. (2005) *Methods Enzymol.*, 394, 483–506.
- 6) Takeuchi, K., Yokogawa, M., Matsuda, T., Sugai, M., Kawano, S., Kohno, T., Nakamura, H., Takahashi, H., & Shimada, I. (2003) *Structure*, 11, 1381–1392.
- 7) Yokogawa, M., Takeuchi, K., & Shimada, I. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12021–12027.
- 8) Nishida, N., Sumikawa, H., Sakakura, M., Shimba, N., Takahashi, H., Terasawa, H., Suzuki, E., & Shimada, I. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, 10, 53–58.
- 9) Ichikawa, O., Osawa, M., Nishida, N., Goshima, N., Nomura, N., & Shimada, I. (2007) *EMBO J.*, 26, 4168–4176.
- 10) Takeuchi, K., Takahashi, H., Sugai, M., Iwai, H., Kohno, T., Sekimizu, K., Natori, S., & Shimada, I. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 4981–4987.
- 11) Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1982) *J. Magn. Reson.*, 48, 402–417.
- 12) Clore, G.M. & Gronenborn, A.M. (1983) *J. Magn. Reson.*, 53, 423–442.
- 13) Mayer, M. & Meyer, B. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 6108–6117.
- 14) Jayalakshmi, V. & Krishna, N.R. (2002) *J. Magn. Reson.*, 155, 106–118.
- 15) Sigfridsson, K. (1998) *Photosynthesis Res.*, 57, 1–28.
- 16) Ubbink, M., Ejdeback, M., Karlsson, B.G. & Bendall, D.S. (1998) *Structure*, 6, 323–335.
- 17) Lange, C., Cornvik, T., Diaz-Moreno, I., & Ubbink, M. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, 1707, 179–188.
- 18) Sato, K., Kohzuma, T., & Dennison, C. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3028–3029.
- 19) Hope, A.B. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, 1456, 5–26.