

高圧 TG 法による光センサータンパク質 TePixD の光反応中における揺らぎ変化検出

(京大院理¹、東大院総合文化²、大阪府立大院理³) ○黒井邦巧¹、田中啓介¹、木村佳文¹、岡島公司^{2,3}、池内昌彦²、徳富哲³、寺嶋正秀¹

【序】

近年タンパク質反応における構造揺らぎの重要性が注目を集めており、タンパク質構造の動的側面の研究に興味を持たれている。安定状態にあるタンパク質分子の構造揺らぎについては、いくつかの手法で揺らぎが研究されつつある一方で、反応中間体の構造揺らぎに関する知見は検出の困難さゆえにほとんど得られていない。本研究では、タンパク質反応過程における揺らぎ変化を、高圧下での過渡回折格子法 (TG 法) により検出することを試みた。TG 法を用いることで、反応に伴う拡散係数変化や部分モル体積変化、エンタルピー変化などのさまざまな熱力学量を高時間分解能で検出することが可能である。構造揺らぎを直接反映する体積揺らぎ、 $\langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle$ は図 1 のように表されるので、圧力を変調させながら TG 法で反応過程に伴う体積変化量を測定することで、反応中の体積揺らぎ変化を検出することが可能である。

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

$$\rightarrow \Delta \bar{\beta}_T = -\frac{1}{\bar{V}} \left(\frac{\partial \Delta \bar{V}}{\partial P} \right)_T$$

$$\left[\begin{array}{l} \beta_T : \text{等温圧縮率} \\ V : \text{部分モル体積} \end{array} \right]$$

図 1 体積揺らぎと等温圧縮率

本研究においては青色光受容タンパク質のひとつである TePixD というタンパク質を対象に高圧 TG 測定を行った。このタンパク質は BLUF ドメインを持つ光センサータンパク質で、環状 5 量体が 2 つ重なり 10 量体を形成して存在する。その光反応は TG 法を用いた先行研究により調べられていて、図 2 のような光反応を行うと考えられている。このような光反応を行う TePixD の TG 信号を、高圧条件下で測定して、中間体の構造揺らぎの検出を試みた。同時にその高圧 TG 信号の解析から、高圧条件下における反応ダイナミクスについても検討した。

【実験】

タンパク質試料として TePixD を大腸菌において発現、精製したものをを用いて、耐圧光学セル内で圧力を 0.1MPa から 200MPa まで変えながら TG 信号を測定した。TG 測定では励起パルス光として 460nm 色素レーザーを用い、840nm のダイオードレーザーを連続プローブ光として用いた。

【結果と考察】

図 3 は各圧力で測定した TePixD の TG 信号である。常圧 (0.1MPa) においてミリ秒領域に見える大きな山型の信号は分子拡散信号であり、10 量体の拡散係数変化反応に対応する。また 40 マ

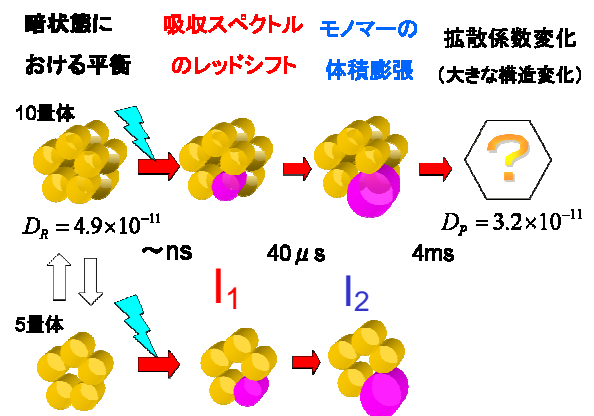


図 2 TePixD の光反応機構

マイクロ秒付近の小さな減衰は体積膨張過程に対応する。

1) 高圧下での反応ダイナミクスの検討

図3のように山型の分子拡散信号の強度が加圧とともに劇的に減少することが分かるがこれは暗状態における10量体、5量体間の平衡が加圧とともに5量体側に傾くためと解釈できる。このことは濃度を変えて圧力に対する挙動の違いを調べることで確かめられた。常圧における5量体と10量体間の平衡定数を見積もることは難しいがおおまかに $K = 1000 M^{-1}$ と見積もられ、これより平衡定数の圧力依存性は図4(a)のよう

になった。また分子拡散信号の解析、体積膨張過程の信号の解析から構造変化の速度、体積膨張速度の圧力依存性が求まりその結果は図4(b)(c)のようになった。これらより求まる10量体、5量体間の体積差と各反応過程での活性化体積も併せて載せてある。

2) 反応中間体揺らぎの検出

40マイクロ秒付近の体積膨張過程を表す信号の圧力依存性から中間体 I_1 、 I_2 の体積揺らぎを、基底状態からの差として検出したものが図5である。これより光励起直後に生成する吸収スペクトルシフトを起こした中間体 I_1 は大きな揺らぎを持ち、体積膨張して生じる中間体 I_2 は比較的小さな揺らぎを持つことが分かった。この結果を、我々は光励起により誘起された大きな揺らぎが、光反応を推進する駆動力になっていると解釈している。

このように、タンパク質の構造揺らぎが反応過程においてダイナミックに変化する様子が、初めて捉えられた。

【参考文献】 K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima., *J. Mol. Biol.* 386, 1290–1300, 2009

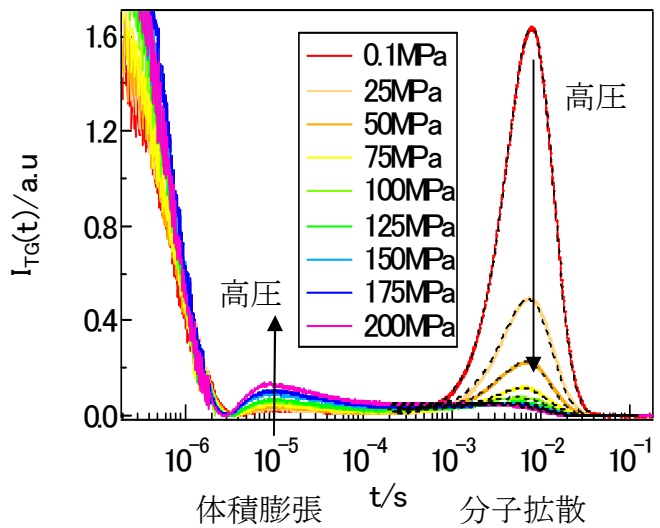


図3 高圧下における TePixD のTG信号

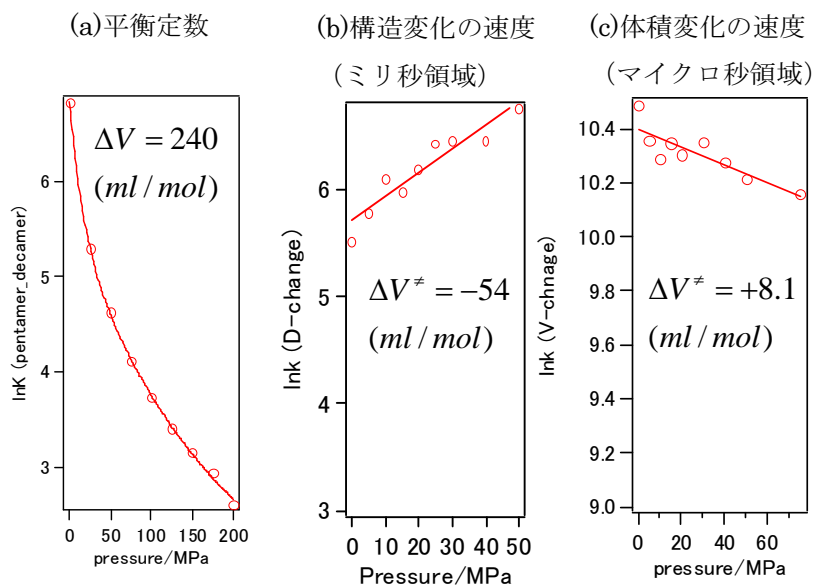


図4 平衡定数、反応速度の圧力依存性

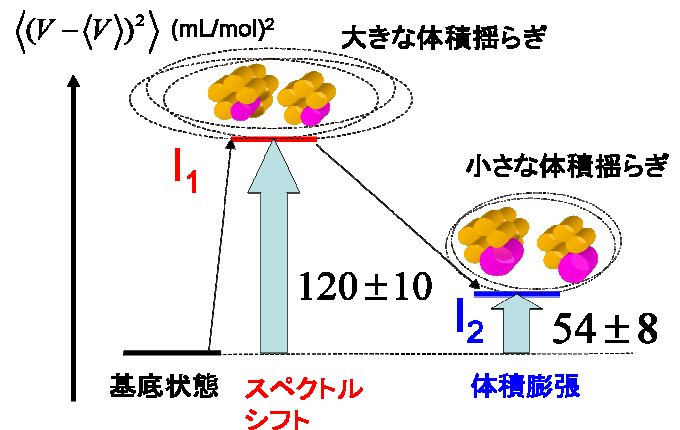


図5 反応座標に沿った体積揺らぎの変化