

1B09

BLUF タンパク質 TePixD と SyPixD における中間体揺らぎと光反応の関係

(京大院理¹、東大院²、大阪府立大院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

Correlation between the intermediate fluctuation and the photoreaction of BLUF proteins TePixD and SyPixD

(Kyoto Univ.¹, Tokyo Univ.², Osaka Prefecture Univ.³) Kunisato Kuroi¹, Keisuke Tanaka¹, Yoshifumi Kimura¹,

Koji Okajima^{2,3}, Masahiko Ikeuchi², Satoru Tokutomi³, Masahide Terazima¹

【序】近年、生体反応におけるタンパク質の構造揺らぎの重要性が指摘されているが、検出手法がなかったために、過渡的中間体が持つ揺らぎに関してはほとんど何も知られていない。我々は高圧下での時間分解過渡回折格子法 (TG法) を用いて、反応体積変化を種々の圧力で測定し、体積揺らぎと直接関係する圧縮率を時間分解で測定することにより、中間体の揺らぎを検出しようとして試みている。

本研究では、まず TePixD と呼ばれる青色光センサータンパク質の構造揺らぎを時間分解で調べ、揺らぎが機能に直接関係することを見出したので報告する。

TePixD の反応はTG法を用いた先行研究により詳しく調べられている[1]。このタンパク質は暗状態では 10 量体と 5 量体の平衡にあり、10 量体のみが光励起によって大きな構造変化を起こすことが知られている。図 1 は現在提案されている TePixD の反応スキームを示したものである。10 量体の光励起によって中間体 I₁ と I₂ を経由して大きな拡散係数変化を示す反応が進行する。以前に、これらの中間体が持つ体積変化の大きさを高圧下で測定することで、基底状態からの差として揺らぎの大きさを検出することに我々は成功している。(図 2)

更に興味深いことに、この 10 量体が起こす構造変化には励起光強度依存性があり、光強度が弱く 10 量体のうちのモノマーユニット 1 つが励起されると構造変化を引き起こすが、励起光強度が強くとモノマー 2 つが励起されるような条件では構造変化が抑制されることが分かっている[2]。このように光強度によって反応を起こしたり起こさなかったりする事実を用いれば、反応に直結する中間体の揺らぎをより明確に示すことができると考えられる。本研究では励起光強度が中間体の体積揺らぎに及ぼす影響を調べ、中間体揺らぎと生体機能の関連を示唆する結果を初めて得ることができた。

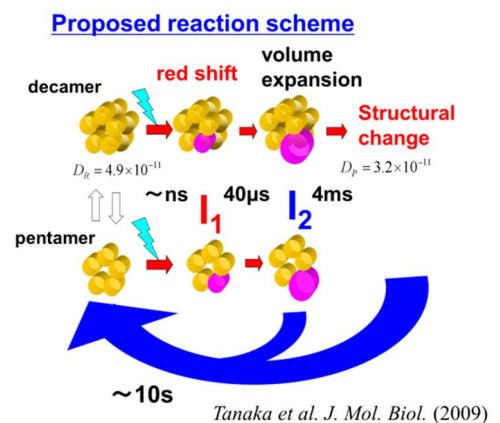


図 1 TePixD の光反応スキーム

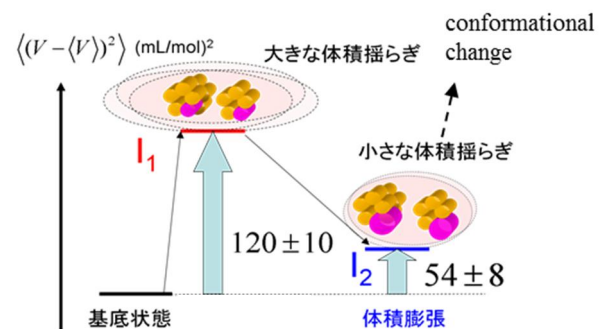


図 2 2つの中間体 I₁、I₂ が持つ体積揺らぎの大きさ (基底状態からの差として計算)

【実験】 試料溶液を耐圧光学セル内で圧力を0.1 MPaから200 MPaまで変えながらTG信号を測定した。信号強度から反応体積を求め、その圧力依存性より圧縮率を求め、体積揺らぎを計算した。今回はNDフィルターを用いて光強度を調節し、さまざまな光強度条件下で中間体の体積揺らぎを検出した。TG信号の測定は試料の励起パルス光に波長450 nmの色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長840 nmのダイオードレーザーを用いた。

【結果と考察】

図3は励起光強度が9.5 mJ/cm²のときにおけるTePixDのTG信号を種々の圧力下で測定した結果を示している。この時間領域におけるTG信号は反応スキーム内の中間体I₁からI₂へ変化する過程を示しており、この信号強度の圧力依存性から中間体I₁とI₂の体積揺らぎを得ることができる。このような測定をいくつかの励起光強度において行い、各励起光強度における体積揺らぎを計算して図4のような結果を得た。ここで中間体の体積揺らぎは図2と同様に基底状態からの差として示してある。中間体I₁、I₂双方において観測される体積揺らぎは、明らかに励起光強度とともに減少することが分かった。各励起光強度における2個励起された種と1個励起された種の比率はTG信号のうちの分子拡散信号部分から求めることができるので、図4の結果からさらに1つ励起された分子と2つ励起された分子でI₁中間体とI₂中間体が持つ体積揺らぎを計算することができる。その結果、モノマー2つが励起されたものと1つが励起されたものを比較すると、2つ励起された種では体積揺らぎが大きく減少することが両方の中間体において分かった。モノマー2つが励起された種では構造変化が抑制されることを考えれば、この結果は中間体の揺らぎが反応の駆動力として重要であることを示唆している。本研究から得られた結果は、中間体の構造揺らぎとタンパク質反応の密接な関係を示している。

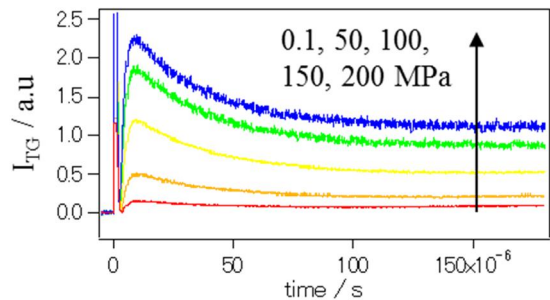


図3 各圧力におけるTePixDの体積変化過程のTG信号 (励起光強度 9.5 mJ/cm²)

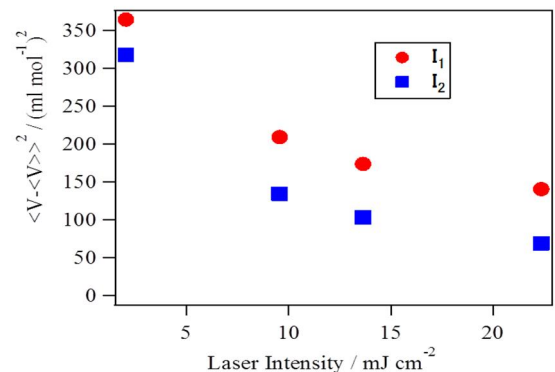


図4 TG信号より求まる各励起光強度におけるI₁とI₂が持つ見かけの体積揺らぎの値。観測される値は1個励起された種と2個励起された種の寄与が混在している。

シアノバクテリアにはTePixDの相同タンパク質としてSyPixDが存在することが知られている。我々は現在TePixDにおいて見出された結果をさらに確かめるべく相同タンパク質であるSyPixDに対しても同様の研究を行っている。SyPixDもTePixDと同様に特有の10量体構造を形成することが知られているが、TePixDの場合とは励起光強度に対する挙動が異なる。SyPixDはTePixDの場合とは逆にモノマー2つが励起されるような強い励起光条件でのみ光解離反応を起こすことが知られている[3]。したがってこのような系で、中間体揺らぎの大きさと光強度の関係がTePixDにおいて観測されたそれと逆の挙動であることを示せば中間体揺らぎの重要性の提起につながると期待できる。本討論会ではこれら相同タンパク質の中間体揺らぎを比較することでPixDの光反応と揺らぎの関係を議論する。

【引用文献】

1,2,3. Tanaka et al (2009, 2011, 2011)