

高速 AFM による作動中のタンパク質の高解像撮影

(金沢大学) ○安藤敏夫

High-resolution filming of proteins in action by high-speed AFM

(Kanazawa University) ○Toshio Ando

【序】タンパク質の構造・機能相関の解明のために様々な技術が利用されているが、主なアプローチは X 線回折や NMR による構造解析と、蛍光顕微鏡や光ピンセットなどによる 1 分子動態解析である。既に 9 万種類のタンパク質の詳細な 3 次構造が明らかにされ、そのリストは今も増え続けている。しかし、得られる情報は静止構造に限られる。1 分子解析では回折限界を破る超解像蛍光顕微鏡が開発されているものの、あくまでも光学プローブの動態解析であり、タンパク質分子そのものは観察できない。すなわち、構造 (モノ) と動態 (コト) を同時に観察する技術が欠如しており、それがタンパク質の機能メカニズムの理解を困難にしてきた大きな要因である。従って、そのような観察を可能にする技術の開発は、困難だが探究すべき重要な課題である。

この観察を可能にする顕微鏡は、高空間分解能、高時間分解能、液中試料観察能、プローブを介せずに実体そのものを直接観察、低侵襲性の 5 つの条件を満たす必要がある。原理的にこのすべての条件を満たす可能性を秘めた顕微鏡は原子間力顕微鏡 (AFM) しかない。AFM は 1 画像を撮るのに分のオーダーの時間がかかるため、高時間分解能をもたない。低侵襲性についてはある程度実現されている。それ以外の条件はクリアしている。従って、AFM を高速化し、低侵襲性と両立させることができれば、生命科学のひとつの夢を実現できる。

この可能性を実現すべく、AFM の高速化に向けた開発が約 20 年前に着手され、種々の技術開発、初期装置の改良を経て、2008 年頃に高速 AFM は我々のグループにより完成された。この新規顕微鏡はタンパク質分子の像を 1 フレーム当たり 40-80 ミリ秒で、機能を乱さずに撮ることができる。この装置は既に約 25 台が世界の研究室で利用されており、種々のタンパク質の動態観察研究が進められている。

【高速 AFM イメージング研究の概要】これまでに、(i) タンパク質の機能に密接した構造変化と分子プロセス、(ii) 自己集合プロセス、(iii) ダイナミックな拡散、相互作用プロセス、(iv) 天然変性タンパク質、(iv) DNA 折り紙やナノロボット、(v) 酵素反応などの高速 AFM 観察が行われている。(i) については、歩くミオシン V、光に応答するバクテリオロドプシン、構造変化が回転伝搬する F_1 -ATPase、中央のチャネルが開く $P2X_4$ 受容体が観察された。力学作用そのものが機能であるモータタンパク質では、機能そのものが動画映像に現れるため、その映像は極めて直接的に機能メカニズムの詳細を明らかにした。バクテリオロドプシンや F_1 -ATPase では、僅か 5 nm 程度の空間内にある複数の分子やサブユニットが識別され、それらの相互関係が直接画像に現れるため、他の手法では発見が困難な協同性が発見された。自己集合過程は、核形成、複数の直列・並列に進む成長過程、自己集合体の極性や非等方性、及び、それに伴う集合キネティクスの不均一性などを

含むため、極めて複雑である。従来の手法ではこれら全体の動的プロセスを解読することは困難であるが、高速 AFM は成長する構造体の異なる場所で直列・並列に進む複数のプロセスを同時に可視化でき、自己集合メカニズムの解明に極めて有効である。天然変性タンパク質は、決まった構造を持たずに機能する従来のタンパク質の概念を覆す新しいタンパク質群であるが、その多様な構造形態を捉える手段がこれまでにはなかった。電子顕微鏡では天然変性タンパク質は細すぎて見えず、また、結晶化しないため X 線結晶構造解析は無効である。従って、天然変性領域を同定するだけでも時間のかかる作業であるが、高速 AFM は天然変性領域を可視化でき、且つ、それがとる多様な構造形態を捉えることができる。結晶性セルロースを分解するセルラーゼのように固液界面で反応が進む酵素では生化学的測定が非常に難しい。それ故、例えば、時間とともに反応が急激に減少するメカニズムや、異なる種類のセルラーゼカクテルで起こる酵素反応速度の著しい増大のメカニズムは長く不明のままであった。高速 AFM の観察により、例えば前者の問題については酵素分子の交通渋滞が原因であることが動画映像で明瞭に示された。以上のように、従来の手法では極めて難しい発見が高速 AFM では容易であることが次々と実証されている。

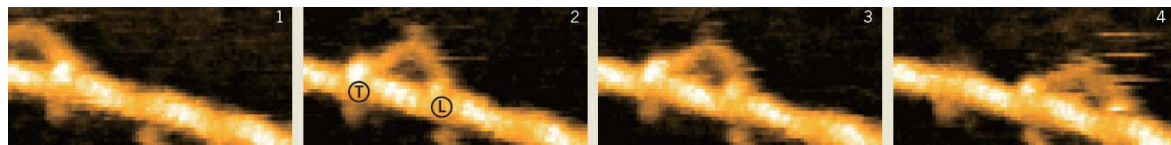


図 ミオシン V の前進運動を捉えた高速 AFM 像

【高速 AFM イメージングによる新発見の例：歩くミオシン V】等価な 2 本の脚をもつミオシン V はアクチン線維上を連続的に運動するため、その運動の様子を連続的に追跡できる。それ故、蛍光顕微鏡などにより詳しい解析が進められ、ATP1 分子の分解毎に 2 本の等価な脚が前脚と後ろ脚の役割を交互に切り替えながら 36 nm の歩幅でアクチン線維上を歩くことが証明された。しかしながら、前進運動のために必要な分子内張力発生と ATPase 反応との関係や、ATP 分解によって開放されるエネルギーがどのように使われるかといったモータタンパク質の本質的な問題まで踏み込むことはできていなかった。歩行運動中、或いは、それ以外の状態のミオシン V 分子の高速 AFM 観察は、既に知られている事実を映像の形で示すだけに留まらず、この本質的な問題に踏み込めるだけの詳細な情報を与えることに成功した。その結果、エネルギー変換機構について驚くべき結論を導き出した。すなわち、後ろ脚に ATP が結合して後ろ脚がアクチンから一旦解離しさえすれば、その後にはエネルギーの注入なしに 1 歩前進し、ATP の加水分解で開放されるエネルギーは前進運動には使われない。ATP の加水分解は、前進の力学過程が一方向に進むことを保証するだけである。この重要な結論は、インターラクティブ高速 AFM という新しい手法によって最近直接証明された。

【謝辞】これらの研究は、研究室の多くの学生とスタッフ、そして多くの共同研究者との成果である。ここに深く感謝します。

【文献】T. Ando, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12468-12472 (2001); T. Ando, et al., Prog. Surf. Sci. 83, 337-437 (2008); T. Ando, Nanotechnology 23, 062001 (2012); T. Ando, et al., Annu. Rev. Biophys. 42, 393-414 (2013); N. Kodera, et al., Nature 468, 72-76 (2010); T. Uchihashi, et al., Science 333, 755-758 (2011); M. Shibata, et al., Nat. Nanotechnol. 5, 208-212 (2010); K. Igarashi, et al., Science 333, 1279-1282 (2011).

小角X線散乱法による球状タンパク質の分子間相互作用の評価

(千葉大院・融合¹, 岡山大・理², 富山県大・工³, 立命館大・薬⁴)今村 比呂志¹, 森田 剛¹, 墨 智成², 磯貝 泰弘³, 加藤 稔⁴, 西川 恵子¹

A small angle X-ray scattering study on the intermolecular interaction of globular proteins

(Chiba Univ.¹, Okayama Univ.², Toyama Prefectural Univ.³, Ritsumeikan Univ.⁴)

[序]

タンパク質の凝集は、結晶化、ホフマイスター系列に従う塩析現象から神経変性疾患原因タンパク質の沈着、タンパク質医薬品の不溶化など、広範な分野に関わる問題である。また我々はタンパク質設計研究を通じて、人工設計タンパク質は不溶化（凝集）しやすく、天然タンパク質が実現しているような水に対する高い溶解性を持っていないことを確認した[1]。これらの問題に対してはタンパク質の分子間相互作用を評価することが有用と考え、本研究では溶液中におけるタンパク質分子配置に起因するX線散乱に着目した。溶液中におけるタンパク質の小角X線散乱の強度 $I(q)$ は以下の式で記述される。

$$I(q) = ckP(q)S(q) \quad (q \text{ は散乱ベクトルの絶対値, } c \text{ はタンパク質濃度, } k \text{ は定数})$$

$P(q)$ はタンパク質の形状、大きさに依存する散乱（形状因子）であり、 $S(q)$ はタンパク質粒子間に起因する散乱（構造因子）である。 $S(q)$ は液体論と同様の取り扱いをすることで、フーリエ変換によりタンパク質粒子間の動径分布関数、さらにOrnstein-Zernikeの式とclosure方程式を組み合わせることで、分子間ポテンシャルと関係づけることができる。我々はこの構造因子 $S(q)$ を利用して、球状タンパク質の分子間相互作用を議論することを目的とした。

[実験]

ミオグロビンの溶液小角X線散乱測定はSAXSess(Anton Paar社, $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, 検出器Imaging Plate)で行った。リゾチーム溶液の測定はPhoton Factory (高エネルギー加速器研究機構, $\lambda = 1.50 \text{ \AA}$, 検出器Pilatus300KW) のBL10Cで行った。放射光照射によるタンパク質の損傷を防ぐため、0.26 wt%リゾチーム溶液は、溶液を流動させながら1分露光し、80回分を平均化した。10 wt%のリゾチーム溶液は、露光2分で2回測定し平均化した。

[結果と考察]

対象としたミオグロビンは、酸素の貯蔵に必須なリガンドであるヘム（ポルフィリン類）を持っている。興味深いことに、ヘムが結合したミオグロビン（ホ口体）が非常に高い水への溶解度を示すのに対して、ヘムが外れたミオグロビン（アポ体）は凝集しやすく、条件によってアミロイド線維となることが報告されている[2]。タンパク質濃度で規格化した散乱強度をみると、ホ口体とアポ体の6.3 wt%ではいずれも0.5 wt%に比べて粒子間相互作用による散乱強度の変化が観測された（図1）。分子間ポテンシャルとして、Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeek (DLVO)モデルの形を仮定し、実験で得られた構造因子 $S(q)$ を再現する分子間ポテンシャルを探索した。結果、図2に示すようにアポ体ではタンパク質分子同士が接触する付近の領域に強い引力を示すポテンシャルが得られた。一方、ホ口体の接触領域の引力は、熱エネルギー（ $\sim k_B T$ ）程度であり、一度分子が接触しても容易に再度離れることが示唆された。得

られた描像は、ホロ体の高い溶解度や、アポ体の不可逆的な凝集現象と合致するものである。興味深いのは、天然構造を保ち、かつ凝集していない条件で、このような相互作用の違いがみられているということである。

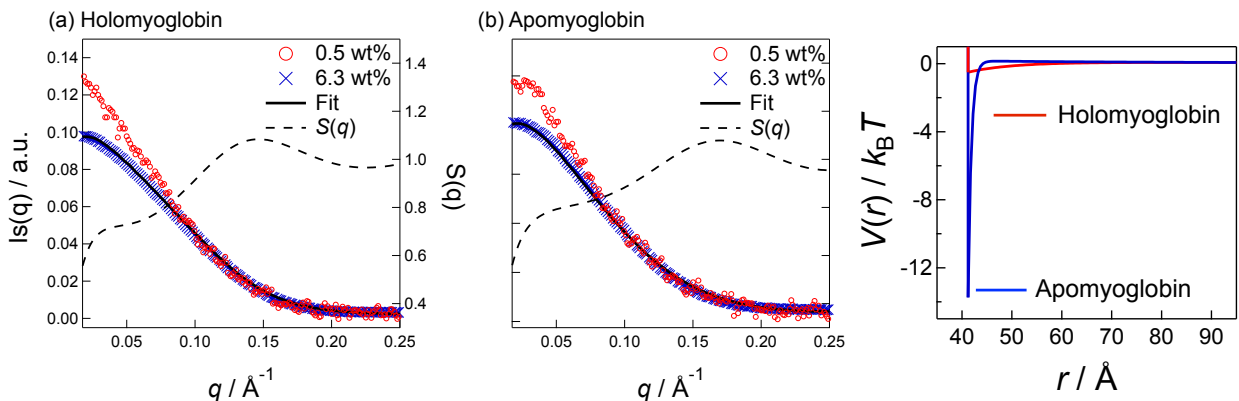


図1. ホロ体(a)およびアポ体(b)ミオグロビンの小角X線散乱

図2. 分子間ポテンシャル

上記の解析においては、ポテンシャル関数を仮定して、さらに既知のパラメータ値（有効電荷、誘電率、デバイ長など）が必要であった。また、タンパク質の分子間相互作用がDLVOモデルで記述できる保証はなく、溶媒分子の寄与による分子間相互作用（例えば疎水性相互作用）が有意な可能性もある。そこで我々は上記の解析とは別に、 $S(q)$ からポテンシャル形状を仮定せず、積分方程式を用いて、ポテンシャルを得る新規の解析法（モデルフリー解析）の開発を進めた。本方法では分子間ポテンシャルを斥力コア部と"それ以外"による寄与とし、後者にrandom phase approximationを適用して、hypernetted-chain近似にbridge補正を考慮するclosure式を導いた。この式を用いることにより、モデルポテンシャル形状を仮定する必要がなくなり、代わりに実験で得られる $S(q)$ を入力として積分方程式を自己無撞着に解くことにより、動径分布関数および分子間ポテンシャルを得ることが可能になった。リゾチームの小角X線散乱の $S(q)$ およびモデルフリー解析の結果を図3に示す。

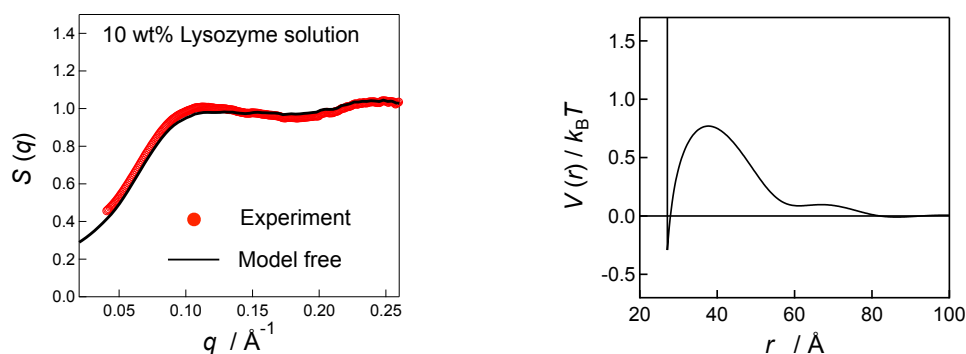


図3. (左) 実験およびモデルフリー解析で得られたリゾチームの構造因子 $S(q)$
(右) モデルフリー解析で得られたリゾチームの分子間ポテンシャル

[1] Imamura, H., Isogai, Y., Kato, M. (2012) *Biochemistry* **51**, 3539-3546.

[2] Fändrich, M., Fletcher, M. A., Dobson, C. M. (2001). *Nature*. **410**, 165–166.

3D14

イエロープロテイン励起状態における超高速水素結合ダイナミクス

(理研・田原分子分光¹、奈良先端大・物質創成²)

○倉持光¹、竹内佐年¹、米澤健人²、上久保裕生²、片岡幹雄²、田原太平¹

Ultrafast Hydrogen-Bonding Dynamics of Photoactive Yellow Protein in the Excited State

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN¹, Nara Institute of Science and Technology²)

Hikaru Kuramochi¹, Satoshi Takeuchi¹, Kento Yonezawa², Hironari Kamikubo², Mikio Kataoka², and Tahei Tahara¹

イエロープロテイン(Photoactive yellow protein: PYP)は紅色光合成細菌より単離された光受容タンパク質で、青色の光に対して負の走光性を誘起すると考えられている。PYPの機能は発色団 p-クマル酸(pCA)のフェムト秒〜ピコ秒スケールで進行する *trans-cis* 光異性化により始まり、多くの過渡種を伴ったミリ秒に渡る光サイクルを通じて発現するとされている[1]。構造・機能相関の観点からこの光サイクル中における PYP の構造変化に興味を持たれており、特に pCA の *trans-cis* 異性、フェノール部位のプロトン化状態、周辺残基との水素結合構造についてこれまで様々な分光的手法を用いて詳細な研究がなされてきた。しかし、従来の手法で観測できるのは多くの場合およそ 100 ps 以降の時間領域で起こる構造変化に限られているため、機能発現機構の解明において重要である初期過程、すなわちフェムト秒〜ピコ秒における構造ダイナミクスに関する包括的な理解は実験上の困難から未だに得られていない。

このような状況のもと以前我々は独自の紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光法(UV-FSRS)を用いて PYP 励起状態の構造ダイナミクスを研究した[2]。観測された指紋領域の共鳴ラマンスペクトルは励起状態の寿命の間同一のスペクトル形状を示したため、発色団 pCA は *trans* 構造を保ち、励起状態における骨格構造変化は小さいことが明らかとなった。一方、フェムト秒可視励起-赤外プローブ分光、芳香族アミノ酸残基に対するピコ秒ラマンを用いた先行研究は、発色団近傍の水素結合状態が光吸収の数ピコ秒後にはすでに変化していることを示した。これらの知見から、発色団周辺の水素結合構造の素早い変化が PYP 初期過程で重要な役割を果たしていることが示唆される[3, 4]。そこで、今回我々はフェムト秒時間分解インパルスラマン分光法(TR-ISRS)を用いて PYP 野生株および変異体の励起状態におけるフェムト秒構造ダイナミクスを詳しく検証した。この時間領域分光によりタンパク質-発色団間の分子間振動など低波数領域の振動構造とダイナミクスが明らかになったので報告する。

実験ではまず光反応を開始させるための励起光 (450 nm, 150 または 40 fs) により電子励起状態を生成させた。任意の遅延時間 ΔT の後、PYPの誘導放出遷移 ($S_1 \rightarrow S_0$) に共鳴する可視極短パルス (520-700 nm, 10 fs) を照射し、インパルス誘導ラマン散乱過程を利用し電子励起状態に核波束運動を誘起した。この核波束運動を時間分解吸収信号のビート成分の形でプローブ光 (520-700 nm, 10 fs) を用いて検出し、励起状態の分子振動を時間領域で観測した。

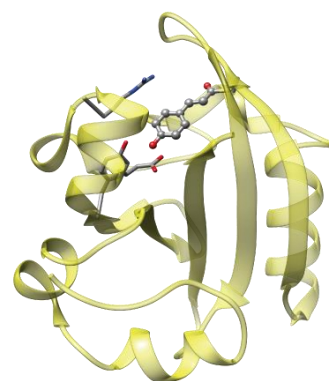


図 1. PYP 中における pCA および周辺アミノ酸残基の構造

図 2A に PYP の $\Delta T=100$ fs おける TR-ISRS 信号の時間変化を示す。信号は誘導放出遷移に伴った励起状態のポピュレーション変化 (図中点線) に加え、励起状態における核波束運動に起因するビート成分を含んでいる。この TR-ISRS 信号を様々な遅延時刻 ΔT において測定し、ポピュレーション成分を差し引いた後に得られるビート成分を図 2B に示す。これらの時間領域の信号をフーリエ変換して得られた周波数領域の振動スペクトルを図 2C に示す。1200 cm^{-1} までの領域に複数の振動バンドが明瞭に観測されている。これらのバンドは励起状態の寿命に対応して 5 ps にかけて減衰するが、その間において特筆すべきダイナミクスが 135 cm^{-1} および 1158 cm^{-1} のバンドに観測された。すなわち 135 cm^{-1} のバンドは励起直後には大きな強度を持つが、他のバンドより素早く 1 ps 以内に減衰する。また 1158 cm^{-1} のバンドは 5 ps にかけて約 7 cm^{-1} の高波数シフトを示した。これら 2 つのバンドの強度、波数は発色団周辺の水素結合構造の違いを鋭敏に反映することが報告されており [5, 6]、観測されたデータは励起状態における水素結合構造の素早い変化を示しているものと考えられる。講演では水素結合構造を修飾した E46Q 変異体の TR-ISRS データとの比較も交え、PYP 光反応初期過程における超高速水素結合ダイナミクスについて詳細な議論を行う。

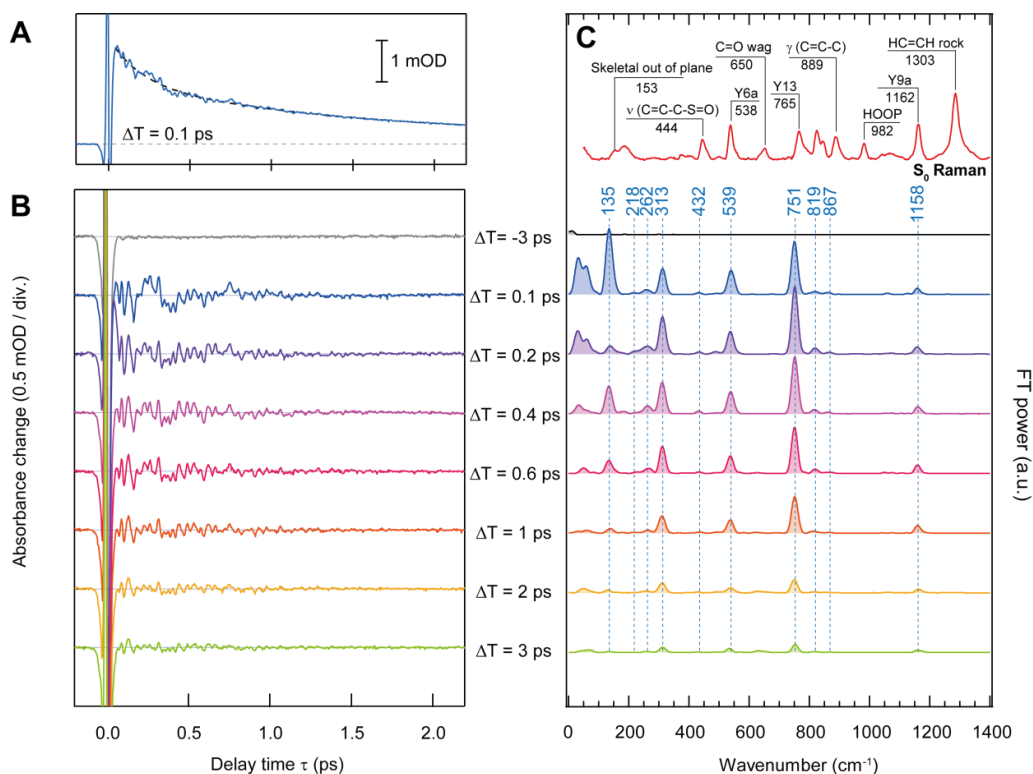


図 2. (A) $\Delta T=100$ fs において得られた TR-ISRS 信号。(B) 各遅延時刻 ΔT における TR-ISRS 信号に含まれるビート成分。(C) ビート成分の FT パワースペクトル、および基底状態のラマンスペクトル。

【参考文献】

- [1] K. J. Hellingwerf, J. Hendriks, T. Gensch, *J. Phys. Chem. A* **107**, 1082 (2003). [2] 倉持光・竹内佐年・上久保裕生・片岡幹雄・田原太平, 第 6 回分子科学討論会, 2012, 1B06. [3] M. L. Groot *et al.*, *Biochemistry* **42**, 10054 (2003). [4] M. Mizuno, H. Kamikubo, M. Kataoka, Y. Mizutani, *J. Phys. Chem. B* **115**, 9306 (2011). [5] H. Chosrowjan *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **108**, 2686 (2004). [6] Y. Zhou, L. Ujj, T. E. Meyer, M. A. Cusanovich, G. H. Atkinson, *J. Phys. Chem. A* **105**, 5719 (2001).

3D16

フェムト秒過渡吸収測定にもとづく BLUF タンパク質活性化機構の検討

○藤澤知績¹、竹内佐年¹、増田真二²、田原太平¹

(理研田原分子分光¹・東工大バイオ研究基盤支援総合セ²)

Femtosecond time-resolved absorption study of photoactivation mechanism of BLUF proteins

○Tomotsumi Fujisawa¹, Satoshi Takeuchi¹, Shinji Masuda², Tahara Tahei¹

(Molecular Spectroscopy Lab., RIKEN¹, Center for Biological Resources and Informatics and Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology²)

【序】BLUF(Blue Light sensing Using FAD)タンパク質はFAD(flavin adenine dinucleotide)を発色団とする生体の青色光センサーである。BLUF タンパク質内でFADが光を受けると、FADの光サイクル反応とタンパク質構造変化が結びついてタンパク質の活性化が起こる。この活性化状態のタンパク質構造変化が生体の青色光感知のシグナルである。

BLUF タンパク質の活性化状態は、光受容前の暗状態に対して10nmほど赤方シフトした吸収バンドを持つのが特徴である。BLUF タンパク質活性化に伴うこの吸収スペクトルシフトは、発色団FAD周辺の水素結合構造変化が原因であると考えられてきた。しかし、そのメカニズムは不明である。またBLUF タンパク質の活性化状態の生成プロセスにも現在のところ2種類の報告があり、BLUF タンパク質の多様な光サイクルの原因と活性化機構の双方の解明が必要とされている。本研究では、新たにBLUF タンパク質PapB(紅色細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 由来)を対象としてフェムト秒過渡吸収測定を行い、BLUF タンパク質の光サイクルとその活性化機構について検討した。

【実験】PapB のフェムト秒過渡吸収測定(時間分解能:0.1ps)には励起光450nmを用いた。サンプル濃度は約0.3mM(Trisバッファー、pH 8.0)に調整し、長寿命の活性化状態の蓄積を避けるため十分に速いフロー速度で測定を行った。

【結果と考察】図1に得られたPapBの過渡吸収スペクトルを示す。励起直後に現れるスペクトル(赤)は第一励起状態(S_1 状態)に由来し、暗状態のブリーチ(~450nm)と誘導放出(~550nm)による2つの負のバンドが観測される。 S_1 状態の減衰に伴って、600nm付近に反応中間体の生成による吸収バンド(青)が現れた後、最終的に長寿命の分散型のスペクトル(緑)が残る。このスペクトル形状は暗状態からのスペクトルシフトによるものであり、活性化状態に帰属できる。

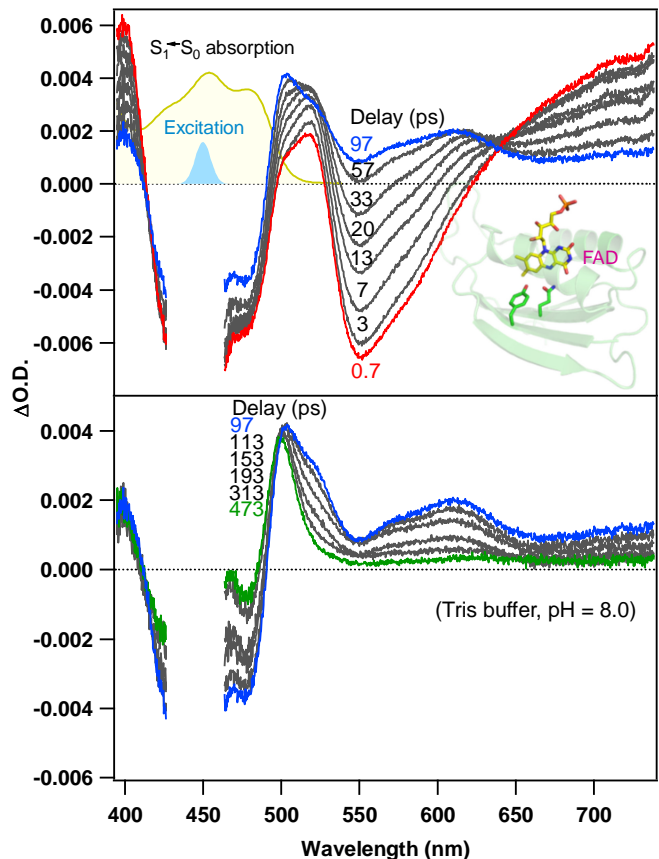


Figure 1. Transient absorption spectra of PapB

図2は特異値分解を利用して行った遅延時間73psでのスペクトル分割の例である。図2と同様に、どの遅延時間においても過渡吸収スペクトルはS₁状態、反応中間体、および活性化状態の3つのスペクトルで構成することができ、得られたスペクトル形状から反応中間体はFADHラジカル(FADH•)に同定された。このことは、PapBの光活性化において発色団FADにプロトン共役電子移動が起こることを意味する。

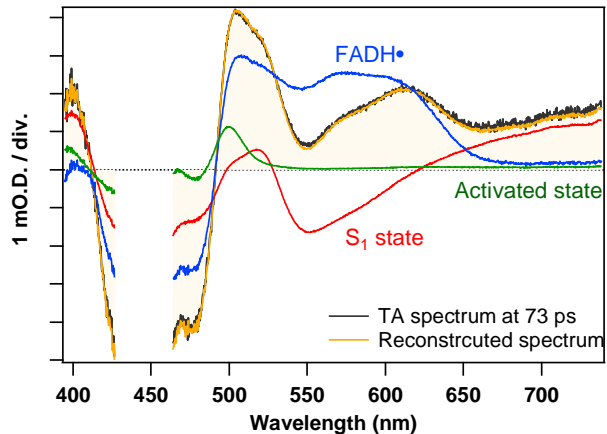


Figure 2. Decomposition of transient absorption spectrum

スペクトル分割から得られたS₁状態、FADH•および活性化状態の時間プロファイル(軽水および重水中)を図3Aに示す。これまでBLUFタンパク質の光活性化過程には、FADH•を経由する活性化(FADH• → 活性化)とS₁状態から直接に活性化(S₁ → 活性化)する2種類のプロセスが報告されており、前者はプロトン移動、後者には電子移動が重要となると考えられてきた。PapBの活性化状態の生成速度には顕著な重水素置換効果が現れており、これはPapBの光活性化にプロトン移動が関与することを示している。

PapBのS₁状態は2段階で減衰するため、PapBの反応プロセスの解析にはFADH• → 活性化に基づいた2状態モデル(図3B)を用いた。FADH•を生成して活性化する状態(a%)と活性化せずに暗状態に戻る状態(b%)を考慮した2状態反応モデルは、PapBの光反応プロセスをよく再現できる(図3A)。また、活性化する状態は速いS₁状態の減衰定数(τ_a, 下表)を持つため、近距離のプロトン共役電子移動が活性化状態の生成に効果的になることを示唆する。講演ではFADH• → 活性化が報告されたSlr1694(シアノバクテリア *Synechocystis* 由来)と比較し、PapBの光サイクルと活性化機構の詳細を議論する予定である。

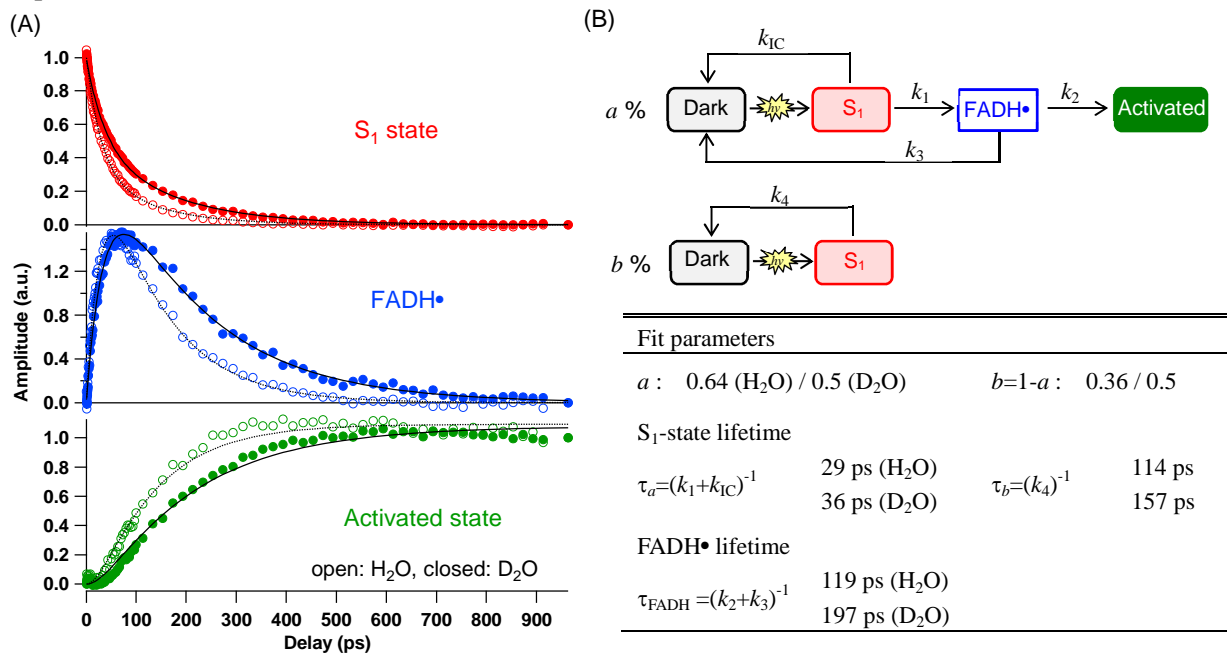


Figure 3. Kinetic analysis of PapB. (A): Temporal profiles (○ in H₂O, ● in D₂O) of S₁ state, FADH• and activated state with the fitting curves based on the reaction model (B). Fit parameters are listed on the table.

3D17

青色光センサータンパク質フォトトロピン1LOV2ドメインの N 末端ヘリックスの構造変化ダイナミクスの検出

(京大院理¹, 大阪府立大院²) ○武田公利¹, 中曽根祐介¹, 直原一徳², 徳富哲², 寺嶋正秀¹

Conformational dynamics of the N-terminal helical region of the phototropin1 LOV2 domain

(Kyoto Univ¹, Osaka Prefecture Univ²) ○Kimitoshi Takeda¹, Yusuke Nakasone¹, Kazunori Zikihara², Satoru Tokutomi², Masahide Terazima¹

【序】 フォトトロピンは高等植物の光屈性や気孔の開閉といった生理機能を制御する青色光センサータンパク質である。その構造は N 末端側に光受容を担う 2 つの LOV (Light-Oxygen-Voltage)ドメイン(LOV1, LOV2)、C 末端側にキナーゼドメインを持ち、キナーゼと LOV2 を結ぶ領域をリンカードメインと呼ぶ。2 つの LOV ドメインのうち LOV2 がキナーゼの活性を支配的に制御しており、その信号伝達にはリンカーに存在するヘリックス(J α)の構造変化が重要だと広く認識されている。また、先行研究によりその構造変化の反応ダイナミクスも明らかになっている[1]。しかし生理化学的な研究により、単離したキナーゼと LOV2(リンカー無し)の混合溶液でもキナーゼの活性が光制御されると報告され[2]、リンカーのみがキナーゼへの信号伝達を担うという見解を覆す多くの議論を呼んでいる。そこで我々は信号伝達経路の新たな可能性として LOV2 ドメインの N 末端側に存在する短いヘリックス構造(A' α)に着目した。A' α は様々なフォトトロピンにおいてアミノ酸配列が保存されており、この部分に変異をかけると生理機能を示さなくなるという報告があるためである[3]。本研究では A' α と J α の相互作用および A' α の構造変化ダイナミクスを明らかにするために様々な変異体を作成し、これらの二次構造及び反応ダイナミクスの測定をおこなった。



図 1: LOV2 ドメイン周りの結晶構造

【実験】 本研究では先行研究を参考にして遺伝子操作により様々な変異体を作成した。具体的には J α のヘリックス構造を壊した I608E, A' α のヘリックス構造を壊した T469I, A' α ヘリックスを取り去った Δ A' α である(図 2)。これらの変異体について円二色性偏光(CD)を用いて二次構造を測定し、2 つのヘリックスの相互作用を考察した。またそれぞれのヘリックス領域の光反応ダイナミクスを調べるため過渡回折格子(TG)法による測定を行った。

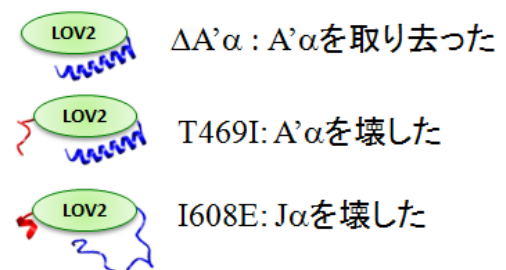


図 2: 実験に用いた変異体

TG 法は体積変化や拡散係数変化を介してタンパク質分子の構造変化を溶液中で時間分解検出できる手法である。励起パルス光に波長 462nm の色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長 835nm のダイオードレーザーを用いた。

【結果と考察】 各サンプルの暗状態における CD スペクトルの測定結果を図 3 に示す。ヘリックス構造に由来する 222nm 付近のスペクトル強度を比較してみると、WT と比べて I608E の CD 強度は大きく減少し、T469I の強度の減少量は小さかった。A'α に比べて Jα は大きいので、この結果は妥当な結果であり、変異をかけることによりそれぞれのヘリックスが暗状態で壊れていることを確認できた。次に、A'α を取り去った ΔA'α の CD スペクトルを測定すると、CD 強度は A'α を壊した T469I よりもさらに減少し、Jα を壊した I608E に近い値を示した。これは A'α を取り去ることによって Jα ヘリックスの安定性が失われ、部分的にヘリックス構造が壊れたためと考えられる。この A'α 領域と Jα ヘリックスの相互作用は MD シミュレーションを用いた先行研究からも指摘されており、その結果を実験的に支持している[4]。しかし、A'α のヘリックス構造自体は Jα 安定性に関与していなかったことから、両ヘリックス内の特定のアミノ酸残基間(おそらく Lys475 と Thr604)の水素結合によりその安定性が保たれていると考えられる。

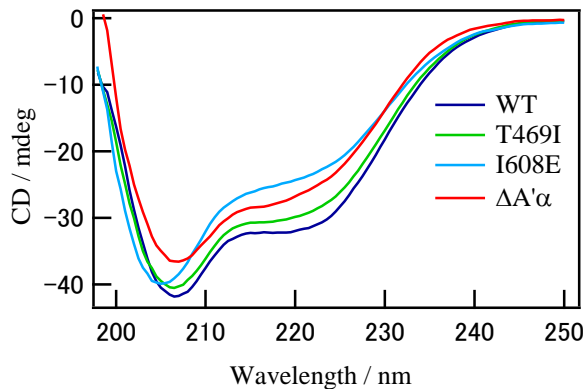


図 3: 各サンプルの CD スペクトル

図 4 に各サンプルの TG 信号($q^2 = 4.4 \times 10^{10} \text{ m}^{-2}$, 23°C, 25μM)を示す。得られた信号は励起分子数で規格化しているが、分子拡散信号の強度が変異をかけることにより大きく変化することがわかった。分子拡散信号は光反応における両末端ヘリックスの構造変化を反映しており、ヘリックスの崩壊度合が大きいほど強くなるという挙動を示す。図 4 より WT の信号強度が最も強いことがわかるが、これは A'α と Jα 両方の

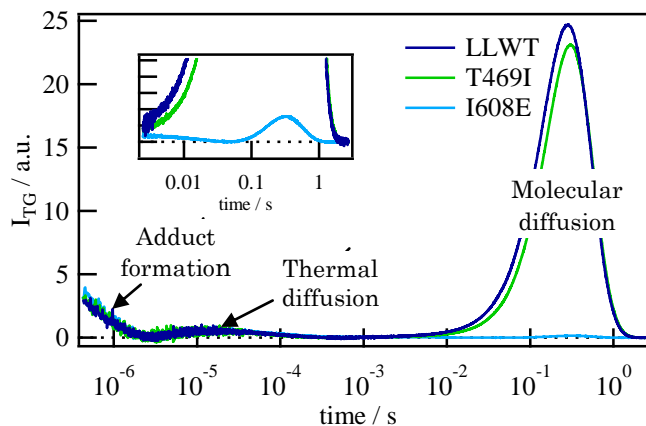


図 4: 各サンプルの TG 信号

ヘリックスが崩壊したためである。一方、T469I の分子拡散信号は WT よりわずかに小さく、I608E では大きく減少する様子が観測された。これはそれぞれ短い A'α と長い Jα を予め壊しているため、光反応におけるヘリックス崩壊量が異なるためである。さらに様々な格子波数で TG 信号の測定を行った結果、分子拡散信号の強度が時間発展する様子が観測され、速度論的な解析から各ヘリックスの崩壊反応速度を見積もることに成功した。その結果、T469I (Jα の崩壊) は 1ms、I608E (A'α の崩壊) は 12ms と求められた。以上の結果などを総合的に考察し、我々は A'α と Jα という二つのヘリックスはそれぞれ独立に構造変化しているという結論を導いた。

Reference

- [1] Nakasone et al. J Mol Biol. (2007), 367: 432-42 [2] Matsuoka et al. PNAS. (2005), 1028(37): 13337-13342
 [3] Aihara et al. J. Biol. Chem, (2012), 287, 13 [4] Zayner et al. J. Mol. Biol. (2012), 419, 61-74

3D18

青色光センサータンパク質フォトトロピン1 LOV2 ドメインの 光反応に対するクラウディング効果

(京大院理¹・大阪府立大院理²) 吉武智之¹・中曾根祐介¹・豊岡継泰¹・直原一徳²・徳富哲²・
寺嶋正秀¹)

Crowding effect on the reaction dynamics of Phototropin 1 LOV2 domain

(Kyoto Univ¹, Osaka Prefecture Univ².) Yoshitake Tomoyuki¹; Nakasone Yusuke¹;
Toyooka Tsuguyoshi¹; Zikihara Kazunori²; Tokutomi Satoru²; Terazima Masahide¹)

【序】タンパク質反応の実測は多くの研究者が取り組む重要な課題であるが、それらの研究の大半は希薄なバッファー内での測定に終始している。一方、生体内の細胞は多様なタンパク質や多糖類、RNA や DNA などの高分子を多量に含んでおり、それら高分子の濃度が約 300g/L にまで及ぶ非常に混みあった環境になっている[1]。このような混みあった環境（クラウディング環境）には通常のバッファー環境に比べ、高分子による排除体積効果が大きい、分子の拡散速度が遅くなるといった性質があり、このような性質はタンパク質の構造や反応に大きな影響を及ぼすと考えられる。実際にクラウディング環境下でのタンパク質反応はバッファー中とは大きく異なる場合もあるという報告がなされており[2]、生体内におけるタンパク質の反応を理解するためにはバッファー中での反応検出だけでは不十分である。つまりクラウディング環境がタンパク質反応に及ぼす影響（クラウディング効果）を調べる必要がある。そこで我々は人工的に構築したクラウディング環境下で青色センサータンパク質フォトトロピン1 LOV2 ドメインの光反応を調べた。用いた手法は主に過渡回折格子(TG)法および過渡レンズ(TrL)法で、得られた結果をバッファー中での反応と比較・検討した。

本研究で用いたフォトトロピン1 LOV2 ドメインのバッファー中での光反応は TG 法、TrL 法により詳細に解明されている(図1)[3]。タンパク質が青色光を受けると光受容を担う LOV ドメインの内部にある発色団 FMN が励起され FMN と LOV ドメインとの間に共有結合が形成される。その後 LOV ドメインの C 末端側に位置するヘリックスが 300 μ秒で LOV ドメインから解離し、約 1m 秒で崩壊する。さらに暗状態に放置しておくと数十秒をかけてタンパク質が基底状態に戻るという光反応サイクルを示す。今回生体内でのタンパク質反応に関する知見を得るため、この光反応に対するクラウディング効果を調べた。

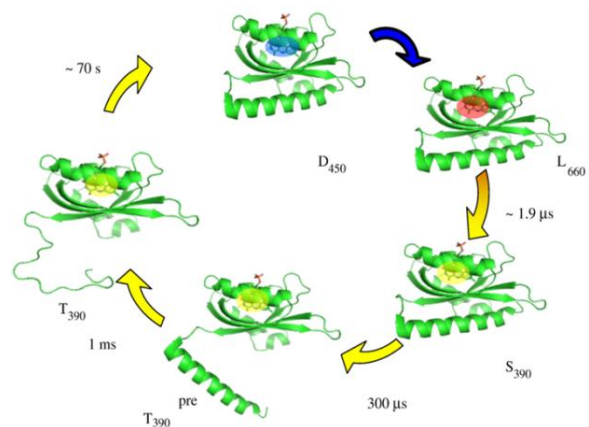


図1.フォトトロピン LOV2 ドメインの光反応サイクル(M.Terazima, 21 July 2010)

【実験】クラウディング環境を人工的に構築するために糖類である Ficoll 70 あるいはタンパク質 BSA をサンプル溶液に溶解した。濃度は上限濃度を生体内細胞と同程度の 300 g/L とした。この環境下での LOV2 ドメインの光反応を捉えるために TG 測定および TrL 測定を行った。これら

の手法は反応に伴う屈折率変化を介して吸収スペクトル変化や体積変化、さらに屈折率変調の解消から拡散係数の情報も与える。よってタンパク質構造や拡散過程に対するクラウディング効果を感度よく検出することが可能である。

【結果と考察】図2に得られたTG信号（分子拡散による信号）を示す。Ficoll 70を加えない場合（希薄なバッファー中）では、C末端ヘリックス構造の崩壊による拡散係数変化を反映した強い信号が観測された。バッファー中での反応物と生成物の拡散係数はそれぞれ $9.3 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $5.7 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ であり、この拡散係数変化はヘリックス構造が壊れる際に起こる分子半径の増加および溶媒との相互作用変化によるものと考えられている。一方、クラウディング環境下では新しい成分が早い立ち上がり信号として出現し、タンパク質の拡散信号は遅い時間スケールへシフトしながら信号強度が弱くなるという挙動を示した。クラウディング剤を加えることで溶液粘度が増加するため拡散信号の遅い時間へのシフトは粘度増加により説明できる。新しい成分はその立ち上がり速度が格子波数に依存したことから拡散信号であると同定されたが、タンパク質に比べて非常に大きな拡散係数を持つことがわかった。その拡散係数の値が発色団 FMN のものとして妥当であったことから、クラウディング環境下では光励起によって FMN が LOV ドメインから抜け出す反応が起こることが示唆された。またクラウディング剤を加えることによる拡散信号強度の減少は、拡散係数の変化量がクラウディング効果により抑えられたことを表している。これはクラウディング剤を加えることによって溶媒の活量が減少し、ヘリックス崩壊に伴う溶媒分子との相互作用形成が抑制されたためと考えられる。さらにクラウディング剤の排除体積効果によって生成物がコンパクトにまとまり分子半径が小さくなった効果もあるかもしれない。

【結果と考察】図2に得られたTG信号（分子拡散による信号）を示す。Ficoll 70を加えない場合（希薄なバッファー中）では、C末端ヘリックス構造の崩壊による拡散係数変化を反映した強い信号が観測された。バッファー中での反応物と生成物の拡散係数はそれぞれ $9.3 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $5.7 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ であり、この拡散係数変化はヘリックス構造が壊れる際に起こる分子半径の増加および溶媒との相互作用変化によるものと考えられている。一方、クラウディング環境下では新しい成分が早い立ち上がり信号として出現し、タンパク質の拡散信号は遅い時間スケールへシフトしながら信号強度が弱くなるという挙動を示した。クラウディング剤を加えることで溶液粘度が増加するため拡散信号の遅い時間へのシフトは粘度増加により説明できる。新しい成分はその立ち上がり速度が格子波数に依存したことから拡散信号であると同定されたが、タンパク質に比べて非常に大きな拡散係数を持つことがわかった。その拡散係数の値が発色団 FMN のものとして妥当であったことから、クラウディング環境下では光励起によって FMN が LOV ドメインから抜け出す反応が起こることが示唆された。またクラウディング剤を加えることによる拡散信号強度の減少は、拡散係数の変化量がクラウディング効果により抑えられたことを表している。これはクラウディング剤を加えることによって溶媒の活量が減少し、ヘリックス崩壊に伴う溶媒分子との相互作用形成が抑制されたためと考えられる。さらにクラウディング剤の排除体積効果によって生成物がコンパクトにまとまり分子半径が小さくなった効果もあるかもしれない。

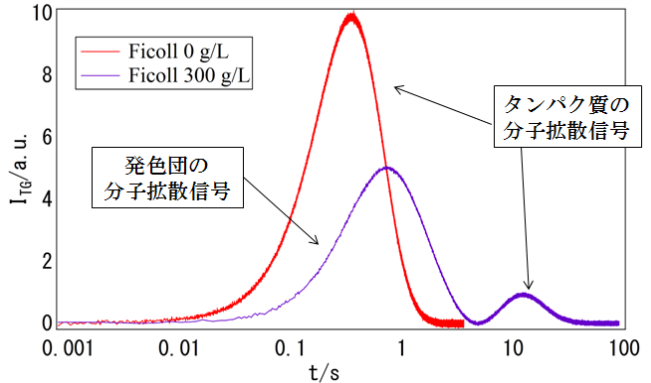


図2. バッファー中とクラウディング環境下でのTG信号

クラウディング剤を加えることによる拡散信号強度の減少は、拡散係数の変化量がクラウディング効果により抑えられたことを表している。これはクラウディング剤を加えることによって溶媒の活量が減少し、ヘリックス崩壊に伴う溶媒分子との相互作用形成が抑制されたためと考えられる。さらにクラウディング剤の排除体積効果によって生成物がコンパクトにまとまり分子半径が小さくなった効果もあるかもしれない。

図3に反応速度に対するクラウディング効果を示す。TrL測定により、ヘリックス構造の解離、崩壊反応の時定数を異なるFicoll濃度下で測定したところ、反応速度はバッファー中に比べ最大3倍遅くなることがわかった。この結果は、速度論的な観点からみても生体内でのタンパク質反応はバッファー中とは異なることを示している。本公演では以上の結果をもとに生体内環境がタンパク質の構造や反応に与える影響を議論する。

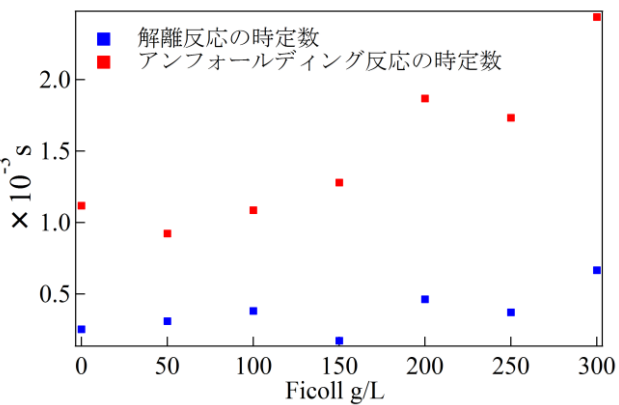


図3. ヘリックス構造の解離・崩壊反応の時定数

【参考文献】

[1] Steven B et al. J.Mol.Biol.(1991) 222,599-620
 [2] Toyooka et al. Photochemistry and Photobiology, 2011,87:584-589
 [3] Nakasone et al. J.Mol.Biol. (2007) 367,432-442

3D19

ハロロドプシン光反応中間体のタンパク質構造ダイナミクス観測

(阪大院理¹、名工大院工²) ○水野 操¹、下尾 祐未¹、神取 秀樹²、水谷 泰久¹

Observation of protein structural dynamics in photointermediates of halorhodopsin

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Misao Mizuno¹, Yumi Shimoo¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに ハロロドプシン (HR) は、光駆動イオンポンプである。レチナール発色団の光異性化がトリガーとなり、さまざまな中間体を経由するサイクル反応[1]の間に、塩化物イオンを細胞外から細胞内へポンプする。レチナールは、タンパク質中に含まれるリジン残基とプロトン化シッフ塩基を介して結合している。HR では、シッフ塩基近傍にアニオン結合サイトがある。この結合サイトには、塩化物イオンの他にもさまざまなアニオンが結合する。レチナール発色団の電子状態は、結合するアニオンの影響を受け、吸収スペクトルの吸収極大波長や C=C 伸縮振動の振動数に変化する。われわれは、昨年の討論会において、塩化物イオンの移動開始前のピコ秒時間領域では、レチナールの異性化に対するタンパク質部分の応答速度が、結合サイトにあるアニオンの影響を受けないことを報告した[2]。今回、HR 内を塩化物イオンが移動するナノ秒からマイクロ秒領域において時間分解共鳴ラマン測定を行い、タンパク質構造ダイナミクスについて、結合サイトにおけるアニオン依存性を調べた。

実験 測定試料には、*N. pharaonis* 由来の HR をバッファー (pH 7.0) に可溶化させたものを用いた。塩化物イオン結合形 (purple 形、 $\lambda_{\max} = 578$ nm)、アニオン非結合形 (blue 形、 $\lambda_{\max} = 602$ nm)、およびギ酸イオン結合形 ($\lambda_{\max} = 563$ nm) の 3 種類の試料溶液をバッファー調製により作製した。時間分解共鳴ラマン測定は、円筒状セルに試料溶液をフローさせ、ポンププローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm、パルス幅約 20 ns) により行った。

結果と考察 図 1 に purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルを示す。一番上のスペクトルは、プローブ光のみで測定したスペクトルで、未反応状態の HR におけるレチナール発色団のスペクトルに対応する。その他のスペクトルは、ポンプ光照射により現れる光反応中間体における発色団の時間分解共鳴ラマンスペクトルである。ポンプ光照射直後の 50 ns のスペクトルでは、972, 1198, 1532 および 1622 cm^{-1} にバンドが現れた。これらのバンドは時間とともに減衰し、代わりに 1012, 1166, 1188, 1200, 1550 および 1651 cm^{-1} にバンドが出現し、その強度が増大した。

はじめに現れたバンドは、出現の時間帯から K 中間体 ($\lambda_{\max} = 570$ nm [1]) のバンドであると考えられる。K 中間

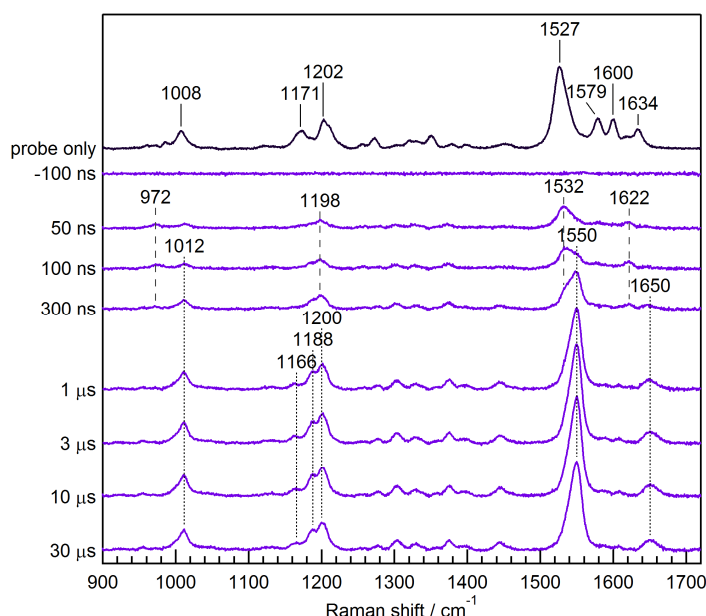


図 1. purple 形 HR の時間分解共鳴ラマンスペクトル。

体のスペクトルは、HR と同じ微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン (BR) において観測されている[3, 4]。BR では、K 中間体の C=C 伸縮振動バンドは 1517 cm^{-1} に観測され、未反応状態のバンド (1528 cm^{-1}) よりも低波数側に現れる。今回、HR では発色団の C=C 伸縮振動バンドが、未反応状態では 1527 cm^{-1} に、K 中間体では高波数側の 1532 cm^{-1} に観測され、BR とは逆の関係がみられた。K 中間体の吸収極大波長は、未反応状態のそれと比較して、BR では長波長側 ($570 \rightarrow 590\text{ nm}$) に、HR では短波長側 ($578 \rightarrow 570\text{ nm}$) にシフトする。したがって、今回の観測結果は、レチナルタンパク質について知られている C=C 伸縮振動の振動数と吸収極大波長の相関関係を満たしていることがわかる。

図 1 のマイクロ秒領域で観測されたスペクトルは、既報のスペクトル[5, 6]との比較から purple 形 HR の L 中間体 ($\lambda_{\text{max}} = 520\text{ nm}$ [1]) に帰属できる。そこで時間分解ラマンスペクトルから、L 中間体の生成ダイナミクスやレチナル発色団周辺の構造を議論する。図 2 に、結合するアニオンの種類の異なる HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの C=C および C=N 伸縮振動バンド領域の拡大図を示す。図 2(a)の purple 形と比較して、(b)の blue 形および(c)のギ酸イオン結合形では、異なるスペクトル変化を示すことがわかった。blue 形では、purple 形で観測されるような K 中間体のバンドは観測されなかった。また L 中間体では、過去の報告[6]どおりに 2 本の C=C 伸縮振動バンドが観測された。これらは、結合サイトにアニオンがないことで、発色団の構造が purple 形とは異なっていることを示唆している。ギ酸イオン結合形では、K および L 中間体のスペクトル形状は、purple 形のものとはよく一致していた。しかしながら、 $10\text{ }\mu\text{s}$ 以降の遅延時間では、 1562 cm^{-1} に新たに C=C 伸縮振動バンドが出現した。ギ酸イオン結合形 HR には、purple 形 HR では現れない M 中間体が生成する[7]ため、 1562 cm^{-1} のバンドは M 中間体のバンドと帰属した。この C=C 伸縮振動バンドの振動数は、BR の M 中間体 [4]ともよく一致していた。バンド強度の時間変化から、L 中間体の生成時間は、purple 形、blue 形およびギ酸イオン結合形で、それぞれ 650 , 750 および 390 ns と求められた。結合サイトにあるアニオンの効果は、ピコ秒領域でのレチナルの異性化に対するタンパク質の応答速度に現れなかった[2]が、ナノ秒以降の塩化物イオンの移動が起こる L 中間体の生成過程の速度に影響を与えることがわかった。

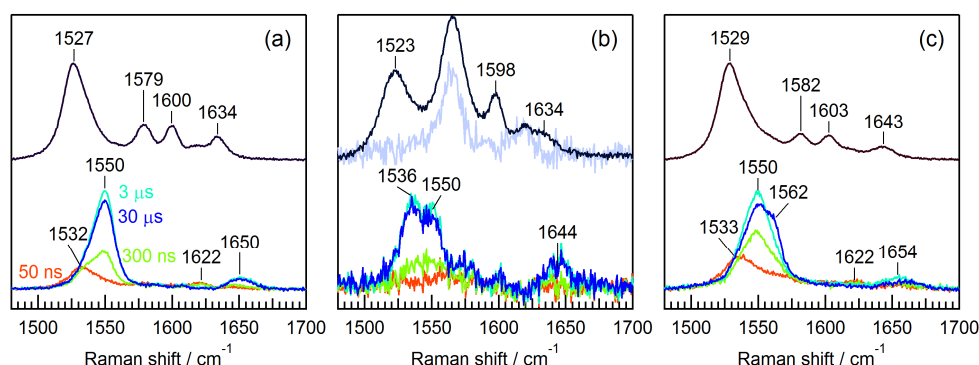


図 2. HR の時間分解共鳴ラマンスペクトルの結合アニオンの影響. (a) purple 形, (b) blue 形, (c) ギ酸イオン結合形. 各スペクトルの上段が未反応状態のスペクトル, 下段が時間分解スペクトル (遅延時間: 橙 50 ns, 緑 300 ns, 水色 3 μs , 青 30 μs). (b)上段、 1565 cm^{-1} 付近のバンドは、遊離したレチナル (薄青色) のバンドである。

参考文献 [1] I. Chizhov and M. Engelhard, *Biophys. J.* **81**, 1600 (2001). [2] 下尾ら, 第 6 回分子科学討論会, 4A05 (2012). [3] R. Lohrmann and M. Stockburger, *J. Ramam Spectrosc.* **23**, 575 (1992). [4] S. Smith, et al., *J. Membr. Biol.* **85**, 95 (1985). [5] J. B. Ames, et al., *Biochemistry* **31**, 12546 (1992). [6] S. Gerscher, et al., *Biochemistry* **36**, 11012 (1997). [7] K. Mevorat-Kaplan, et al. *Biochemistry* **44**, 14231 (2005).

UV-Bセンサータンパク質UVR8の解離反応に重要な構造変化検出

(京都大学*, Scripps 研究所**, Glasgow 大学***) ○宮森一彰*, 中曽根祐介*
人見研一**, Christie John M***, Getzoff Elizabeth D**, 寺嶋 正秀*

Study on the molecular mechanism of dissociation dynamics of UV-B sensor protein UVR8

(Kyoto Univ.*, Scripps Research Institute**, Glasgow Univ.***)

○Takaaki Miyamori*, Yusuke Nakasone*, Kenichi Hitomi**

Christie John M***, Getzoff Elizabeth D**, Masahide Terazima*

【序】シロイヌナズナ由来の UV-B (280-315nm) センサータンパク質 UVR8 は、紫外光ダメージからの防護・修復のための遺伝子発現を誘導する。その構造は図 1 に示すように 7 枚の β プロペラ構造がリング状に連なった形状を持つ。特徴的なのは計 14 個におよぶトリプトファンが規則正しく配置されており (図 1 の紫で示した個所)、中央に位置するトリプトファンクラスターが紫外光吸収を担っている点である。すなわち、一般的な光センサータンパク質は特定の発色団を有することで光を吸収するが、UVR8 はタンパク質のアミノ酸自体が光を吸収して反応する。UVR8 は電荷を持つアミノ酸が表面に多く配置されており、静電相互作用により暗条件ではダイマー構造を形成している。このダイマーに紫外光を照射するとモノマーへの解離反応が起こり、UVR8 モノマーの C 末端領域が下流分子である COP1 と相互作用することで信号伝達が達成される。

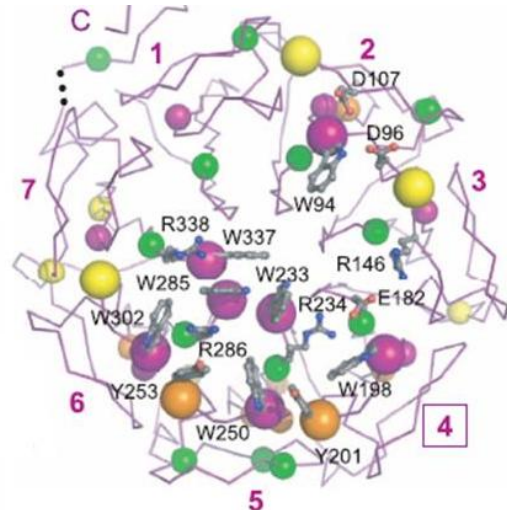


図1 UVR8の構造と重要な残基および β プロペラのナンバリング

我々はこれまで過渡回折格子 (TG) 法を用いて UVR8 の反応検出を行ってきた。過渡回折格子法は拡散係数変化という観点から分子の構造変化や分子間相互作用を高い時間分解能で捉えることができるため、UVR8 の光解離分子機構を明らかにすることができる。その結果、解離反応が光励起後約 100 ms で起こることを明らかにした。また解離反応の分子機構を探るため、暗状態でモノマーとして存在するようなミュータントの測定を行った。具体的には静電相互作用に重要な 2 つの Arg を Ala に置換した R146A/R286A の測定であり、その信号解析からモノマー内部の構造変化が 3 ms の時定数で起こることを見出した。しかし R146A/R286A の測定はモノマー内部の動きを調べるうえで重要であるが、R286 は紫外光吸収に重要なトリプトファンクラスターの近傍に位置するため、光反応への影響という懸念が残る。この問題を解消するため、今回 D96N/D107N という新たなミュータントを作成した。これら Asp はトリプトファンクラスターから離れた位置にありながら、Asn に置換することでモノマーとして安定に存在するようになる。

この試料の反応測定からモノマー本来の反応を明らかにできるだろう。さらに R338A というモノマーミュータントも作製した。R338A はトリプトファンクラスターに近い位置にあるため、光反応への影響が拭いきれないミュータントであるが、信号伝達への寄与が予想されている 1 番目と 7 番目の β プロペラに挟まれる位置にあるため、この領域の動きを捉える上で最適である。これらミュータントの測定により解離反応が引き起こされるメカニズムの解明を目指した。

【実験】TG 法を中心に種々の分光法を用いて、これらミュータントの光反応ダイナミクスを測定した。ポンプ光として Nd-YAG レーザーの四倍波(266nm)、プローブ光として連続発振のブルーレーザー(449nm)あるいは赤色レーザー(633nm)を用いて様々な時間スケールでの TG 信号を測定した。

【結果と考察】図 2 に D96N/D107N と R146A/R286A を同じ条件で測定した分子拡散信号を示す。ともに立ち上がりと減衰からなる信号が観測され、これは光励起によって拡散係数変化が誘起されたことを表している。つまりタンパク質構造が D96N/D107N でも変化したことを意味しているが、その信号強度は非常に小さいことがわかった。解析の結果、D96N/D107N では反応物と光生成物の拡散係数がそれぞれ $D_R=6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $D_P=6.8 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ と見積もられた。この変化量は R146A/R286A ($D_R=6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $D_P=7.2 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$) よりも小さいことから、ミューテーションの位置によって構造変化の様相が変わることがわかった。図 3 には D96N/D107N を様々な格子波数で測定して得られた分子拡散信号を示す。分子拡散信号は格子波数を変えることにより表れる時間スケールが変わるが、それに伴い信号の強度が大きく変化する様子が観測された。これは観測している時間スケールで拡散係数変化を伴う反応が起こっていることを意味しており、速度論的解析の結果、反応時定数は 50 ms と見積もられた。この値は WT における解離反応の速度に近く、同じモノマーである R146A/R286A より遅い。このことからミューテーションをかける位置によって反応速度にも影響があることがわかった。D96N/D107N が光反応に重要なクラスター構造を保持しているため、今後はこの結果を基にモノマー内の反応を議論する予定である。一方、R338A に対しても同様の解析を行った結果、反応物と生成物の拡散係数はそれぞれ $6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $7.3 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、反応速度は 5.3ms と R146A/R286A の値と近い実験結果が得られた。これはトリプトファンクラスター周りの残基を変えると光反応に対して同様の効果があることを示唆している。現在は下流分子との相互作用に重要と考えられている C 末端領域の動きを捉えるため、全長 UVR8 から C 末端 57 残基を切ったミュータントを作成し測定を行っている。これらの結果を比較・検討することで光反応分子機構への理解を深めていく予定である。

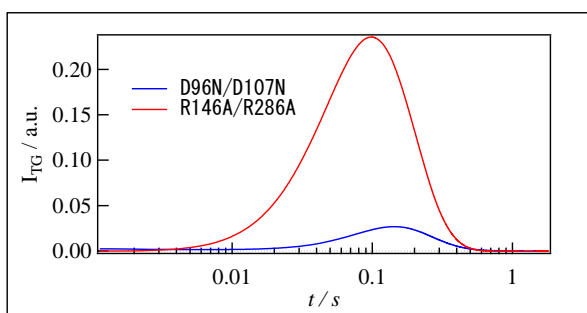


図 2 D96N/D107N と R146A/R286A の TG 信号比較

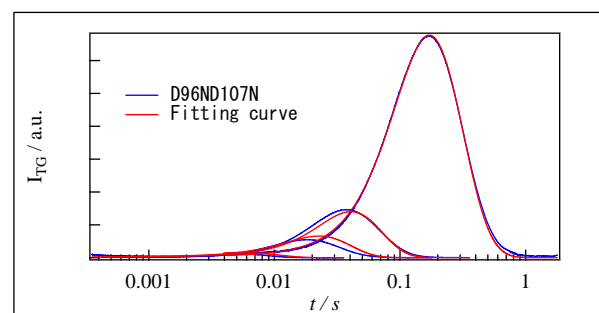


図 3 D96N/D107N の分子拡散信号の格子波数依存性

急速緩衝液交換法による時間分解全反射赤外分光法の開発

(分子研¹, 総研大², ユニソク³) ○古谷 祐詞^{1,2}, 木村 哲就^{1,2}, 岡本 基土³

Development of a rapid buffer-exchange system for time-resolved ATR-FTIR spectroscopy

(Institute for Molecular Science¹, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI)², UNISOKU Co., Ltd.³)

○Yuji Furutani^{1,2}, Tetsunari Kimura^{1,2}, Kido Okamoto³

【序】 イオンチャネルや G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 等の膜タンパク質の動作機構を解明するためには、それらが外界からの情報を受容し、活性化状態を形成する過程での構造変化を明らかにする必要がある。さらに、GPCR においては、G タンパク質との相互作用やその活性化機構を明らかにすることも重要である。これまで光を受容するロドプシンなどの光受容タンパク質に対しては、パルスレーザー等を用いることで、フェムト秒から分に至る様々な時間領域での構造変化やタンパク質間相互作用が様々な分光学的手法により明らかにされてきた。一方、多くのイオンチャネルや GPCR では、基質やイオンなどの結合に伴う構造変化を解析する手法が求められており、ストップフロー法などの手法が考案されている。しかしながら、測定には多量の試料を必要とするなど、改善の余地がある。本発表では、全反射赤外分光法と組み合わせることで、数マイクログラム程度の膜タンパク質試料での時間分解計測を可能とする新しい手法を開発し、塩化物イオンポンプであるファラオニスハロロドプシン (pHR) に適用した^[1]。

【実験方法】 急速溶液交換装置および ATR セル上に構築したチャンバーを図 1 に示す。2 本のシリンジの内、1 本には反応させるための溶液、もう 1 本には洗浄用の溶液を入れる。溶液はリザーバーに準備しておくことで、装置が必要に応じてシリンジに充填する。本研究では、pHR の塩化物イオンおよび硝酸イオンの結合を解析するために、1 つは 200 mM MOPS (pH 7.0), 20 mM NaCl もしくは NaNO₃、もう 1 つには 200 mM MOPS (pH 7.0)のみを使用した。サンプルが存在しない状態での溶液交換反応においては、50 mM NaNO₃ と超純水を使用した。

ATR セルの上に図 1(B)に示すようなチャンバーを作製した。流路などを含めてチャンバーの容積は 40 μ l 程度であり、1 回の溶液交換反応では 100 μ l の溶液を使用した。シリンジの容積は 2.5

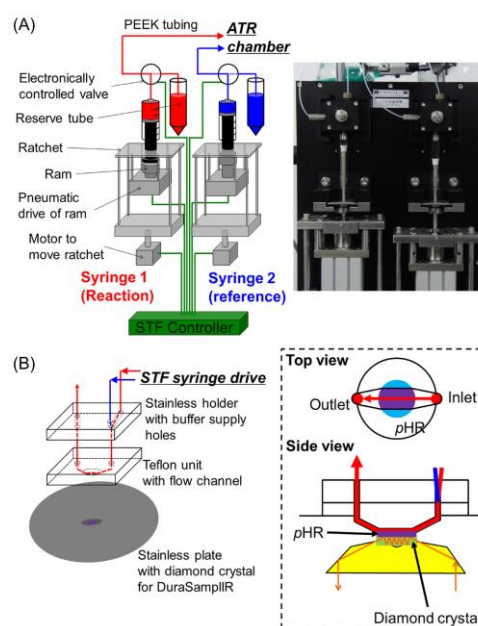


図 1 急速溶液交換装置(A)および ATR チャンバーの模式図(B) ([1]より転載)

mL であり、17 回の交換反応毎に、リザーバーからシリンジへと溶液を再度充填する操作を行うことで、計測に必要な回数の交換反応を繰り返した。反応用のシリンジは 0.12 MPa の圧縮窒素ガスにより駆動し、洗浄用のシリンジはモーター駆動で操作した（装置の動作については[1]の BIOPHYSICS 誌の Web サイトにて確認可能）。ステップスキャン計測においては、波数分解能 8 cm^{-1} 、 $1900\text{--}988\text{ cm}^{-1}$ の波数領域、333 点のサンプリングポイントにおいて、 2.5 ms の時間分解能で 2000 点、合計 5 s の時間分解計測を行い、インターフェログラムを構築した。得られたインターフェログラムはフーリエ変換操作にて、シングルビームへと変換し、溶液交換前の時間領域のスペクトルをリファレンスとして計算することで時分割の赤外差スペクトルを得た。

【結果と考察】 ATR セル上で、試料を何も乗せずに、 50 mM の硝酸塩溶液を超純水と交換する反応を行ったところ、約 25 ms で溶液が置換していることを硝酸イオンの NO 伸縮振動 (1350 cm^{-1}) バンド強度の時間変化より確認した。次に、約 $8\text{ }\mu\text{M}$ の pHR リポソーム再構成試料 $10\text{ }\mu\text{l}$ を ATR セル上で乾燥させた後に、 200 mM MOPS (pH 7.0) の緩衝液に浸した。その後、硝

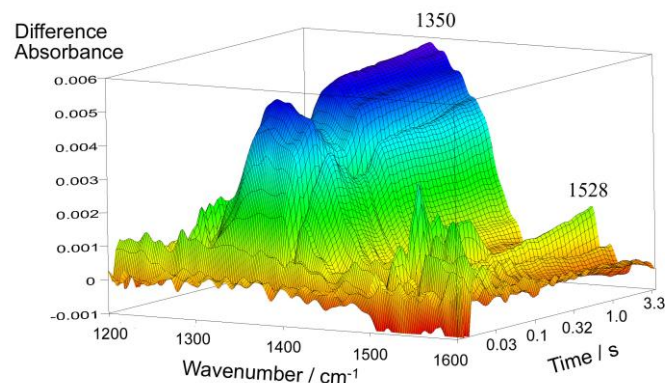


図 2 pHR の硝酸イオン結合に伴う時分割赤外差スペクトル ([1]より転載)

酸塩溶液の交換実験と同様に溶液交換装置を駆動させ、硝酸イオンおよび塩化物イオンの結合実験を行った。硝酸イオンの結合過程について図 2 に示した。硝酸イオンの NO 伸縮振動の増大が約 25 ms で増大する反応が同様に確認され、それと共にレチナールのポリエチレン共役鎖の C=C 伸縮振動 (1528 cm^{-1}) に由来するバンドの増大も確認できた。また、塩化物イオンの結合に関しても、同一の試料に対して行った。その結果、 1528 cm^{-1} のバンドは硝酸イオンよりも大きい変化であったが、これは pHR において硝酸イオンの解離定数が 11 mM であり、塩化物イオンでは 2 mM であることを反映しているものと考えられる。塩化物イオンの結合過程について、指数関数でフィッティングしたところ、 35 ms と 1.3 s の時定数が得られた。これは、pHR を界面活性剤で可溶化した条件下で、ストップフロー法を可視吸収分光計測で行った実験回から得られた値、 16 ms と 200 ms よりも少し遅い反応であった。最初の時定数については装置の溶液交換速度が遅いためかもしれないが、脂質と界面活性剤との試料条件の違いを反映しているのかもしれない。

【今後の展望】 本手法は、膜タンパク質のイオンや基質などの結合及び解離過程での時分割赤外差スペクトル計測を微量の試料で可能とする新規手法である。イオンチャネルやトランスポーター、GPCR 等の膜タンパク質の動作機構の研究に有用な手法になるものと期待している。

【参考文献】

- [1] Furutani, Y., Kimura, T., and Okamoto, K. (2013) *BIOPHYSICS* 9, 123-129.
(装置の動画は https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/9/0/9_123/article/supplement)
- [2] Sato, M., Kanamori, T., Kamo, N., Demura, M., and Nitta, K. (2002) *Biochemistry* 41, 2452-2458.