

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

### Crowding effect on the reaction dynamics of Phototropin 1 LOV2 domain

(Kyoto Univ<sup>1</sup>, Osaka Prefecture Univ<sup>2</sup>.) Yoshitake Tomoyuki<sup>1</sup>; Nakasone Yusuke<sup>1</sup>;  
Toyooka Tsuguyoshi<sup>1</sup>; Zikihara Kazunori<sup>2</sup>; Tokutomi Satoru<sup>2</sup>; Terazima Masahide<sup>1</sup>)

【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。

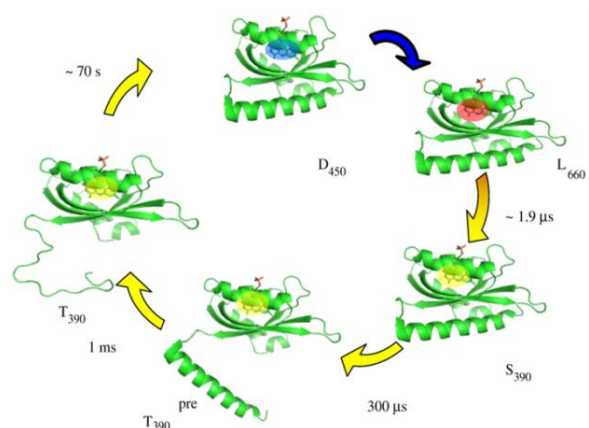


図1.フォトトロピン LOV2 ドメイン  
の光反応サイクル(M.Terazima, 21 July 2010)

【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。

バッファ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。

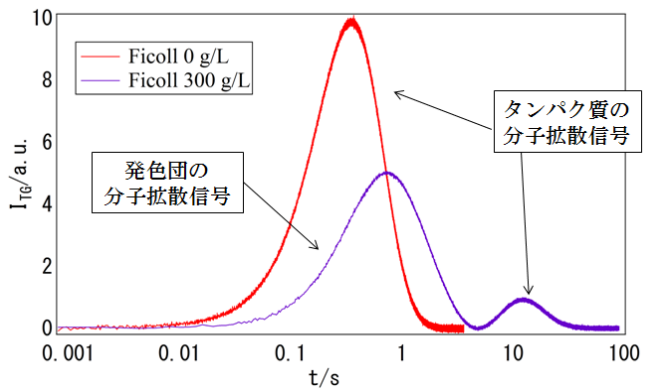


図2. バッファ中とクラウディング環境下でのTG信号

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。

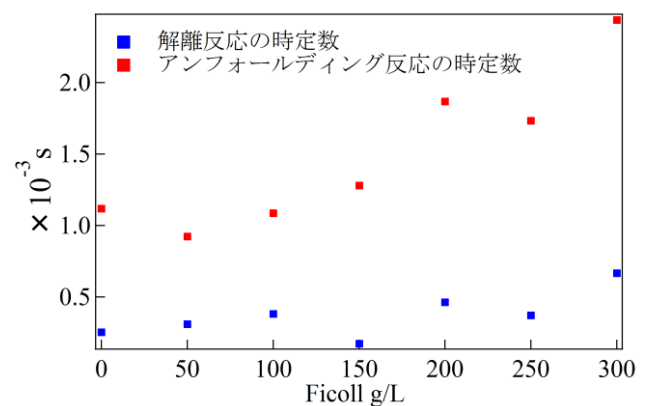


図3. ヘリックス構造の解離・崩壊反応の時定数

【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