

BLUF タンパク質 SyPixD の反応への圧力効果

(京都大学院・理¹, 大阪府立大学院・理², 東京大学院・理³)○中島 翼¹, 黒井 邦巧¹, 岡島 公司^{2,3}, 池内 昌彦³, 徳富 哲², 寺嶋 正秀¹

The pressure effect on the reaction of the BLUF photoreceptor SyPixD

(Graduate School of Science, Kyoto University¹, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University²,
Graduate School of Arts and Science, Tokyo University³)○Tsubasa Nakajima¹, Kunisato Kuroi¹, Kouji Okajima², Masahiko Ikeuchi³, Satoru Tokutomi², Masahide Terazima¹

【序】地球上には高圧下で存在する生物が数多く存在し、彼らがつタンパク質は高圧条件に対応しながら生体の活動を支えている。こうした生物の活動を分子論的に明らかにするためにはタンパク質の高圧下での反応を明らかにすることが重要である。しかし高圧下での研究において、タンパク質の静的状態を調べる手法は多くあるが反応のダイナミクスそのものを調べる手法は少ない。またタンパク質反応における揺らぎの重要性が説かれており、揺らぎについて数値的な考察をすることは大きな意味をもつ。こうした点において、タンパク質の構造揺らぎと反応活性化体積はそれぞれ体積と反応速度定数の圧力微分を用いて表現されるため、圧力依存性の実験から常圧での揺らぎの性質を調べることは有用である。今回、我々は過渡回折格子(TG)法によって高圧下での反応ダイナミクスを調べると同時に体積変化量や反応速度定数変化を求め、そこから常圧における構造揺らぎや活性化体積などの熱力学量を調べた。

ここでは SyPixD と呼ばれる BLUF タンパク質を研究対象として選んだ。このタンパク質は、青色光を吸収することでシアノバクテリアの走光性を制御する光センサータンパク質である。常圧においては 10 量体と 2 量体の平衡状態で存在しており、青色光で励起すると発色団まわりの水素結合ネットワークの変化が誘起され、吸収スペクトルが約 10 nm 長波長側にシフトする。さらに、10 量体はおよそ 45 ミリ秒で体積収縮を起こし、励起光強度が強い場合にのみおよそ 350 ミリ秒で 2 量体への解離反応が起こる [1]。今回は強い励起光による反応に注目し、その反応への圧力効果を調べた。

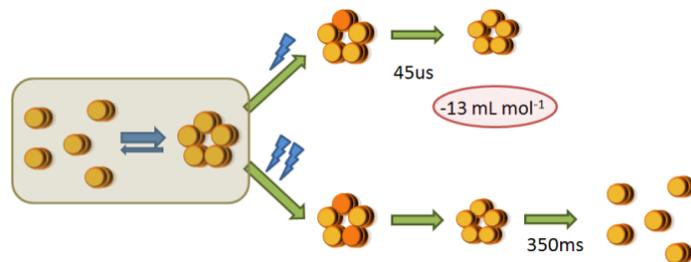


図 1. SyPixD の常圧での反応スキーム

【実験】高圧セルを用いることで様々な圧力環境下での TG 測定を行った。TG 法測定に置いては、462 nm のパルスレーザーを用いてタンパク質を光励起し、反応を開始させた。その後の体積変化や拡散係数変化を、840 nm の連続発振レーザーでプローブした。今回はまずサンプルの分子拡散信号を測定し、圧力による反応量子収率と解離反応速度定数の変化を調べた。さらに TG 解析から得られた体積変化量や反応速度の圧力依存性より、タンパク質の持つ構造揺らぎや活性化体積の大きさを求めた。

【結果と考察】 図2に加圧による分子拡散によるTG信号の圧力依存性を示す。先行研究により、その信号の立ち上がりと減衰はそれぞれ生成物（2量体）と反応物（10量体）の拡散によるものであることが分かっている[1]。図より圧力を加えると信号強度が減少していることが分かる。この挙動は、光励起反応の収率が下がり生成物量が減少した影響であると推測でき、単一波長過渡吸収測定によりその推測が正しいことが確認された。

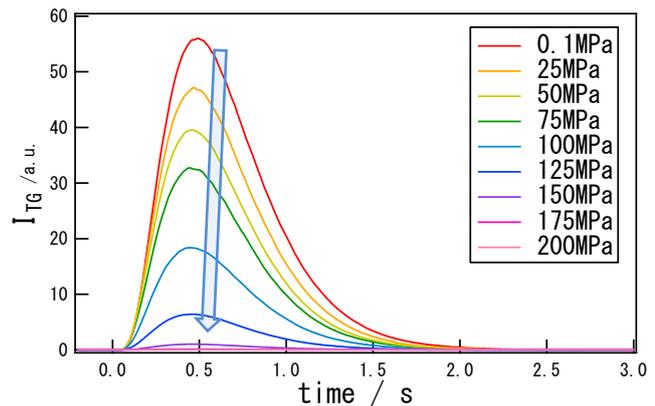


図2. 分子拡散信号の圧力依存性

また、各圧力の信号を解析することにより解離反応の速度定数が圧力によって増加していることが求められ、圧力によって解離反応が促進されていると分かった。このことはこの解離反応の活性化体積が負であることを示しており、具体的に -44 mL/mol であると算出できた。

図3に早い時間領域のTG信号の圧力依存性を示す。この時間領域は図2で示したのものよりも早いスケールであり、反応物が励起されて吸収変化を示す中間体が生じてから体積変化を起し始めるまでの信号を表している。ここでTG信号のベースからの浮きの部分は反応物と中間体の屈折率変化の差を表しており、図よりこの大きさが圧力により増加していることが分かる。

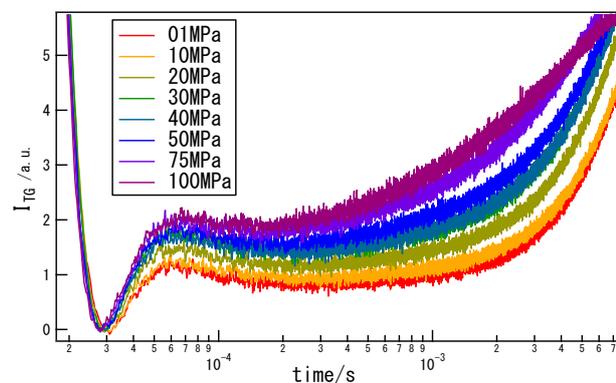


図3. 早い時間領域のTG信号圧力依存性

そこでサンプルと濃度を合わせた熱参照試料の測定を並行して行い、各圧力での体積差を算出した。

この計算においては圧力による反応効率変化も考慮に入れた。この圧力依存性から反応物と中間体の間の揺らぎの差を求めると、 $+113 \text{ (mL/mol)}^2$ であると算出できた。光励起によるこの揺らぎの増大がそのあとに続く反応にとって重要な役割を果たしていると考えられる。本講演ではタンパク質反応への圧力効果から話を始め、反応と構造揺らぎ、活性化体積の関係性についての議論へと進めていく予定である。

【参考文献】

[1]Tanaka et al. *J.Mol.Biol.*(2011) 409,773-785