

光応答性 DNA 結合タンパク質 EL222 の反応ダイナミクス研究

○高門 輝, 中曽根 祐介, 寺嶋 正秀
(京大院 理)

Reaction dynamics of light-regulated DNA-binding protein EL222

○Akira Takakado, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima
(Kyoto Univ. Sci.)

【序】

生物は様々な光センサータンパク質を持っており、光励起によるタンパク質の構造変化および下流分子との相互作用変化によって光情報を伝達し、種々の生理機能を制御している。これら光応答反応を時間分解検出することは分子レベルでのシグナル伝達機構を明らかにするために不可欠である。

海洋性バクテリア *Erythrobacter litoralis* 由来のタンパク質 EL222 は光受容ドメイン(LOV ドメイン)と DNA 結合ドメイン(HTH ドメイン)からなる青色光センサータンパク質である[1]。暗状態でモノマー構造を持つ EL222 は、青色光励起によりタンパク質構造が変化し、ダイマー構造で DNA と結合する(図 1) [1,2]。EL222 の生理機能として、青色光下では EL222 の特異的 DNA 認識配列の下流に位置する DNA 修復酵素の発現を促すことにより、紫外光で損傷を受けた DNA を修復するなどの役割が予想されている[2]。また光により転写活性を制御できる特性を生かして、人工的に転写活性を制御する光遺伝学への応用も行われており[3]、今後の展開が期待されるタンパク質である。本研究では過渡回折格子(TG)法を主に用いて、光励起された EL222 の高次構造変化を捉え、さらに DNA との結合過程を時間分解検出することを目的として測定を行った。

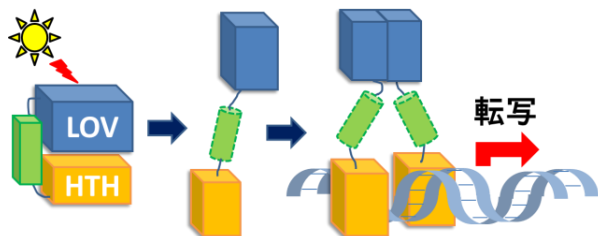


図 1. EL222 の反応モデル

【実験】

EL222 タンパク質は大腸菌を用いて発現させ、クロマトグラフィーによる精製を行った。TG 測定では励起光として 462nm のパルスレーザーを、プローブ光として 840nm の連続光レーザーを用いた。まず DNA を含まない EL222 全長タンパク質溶液での測定を行い、光励起によって引き起こされる会合反応を検出した。また比較用に HTH ドメインを含まない LOV ドメインのみからなるサンプル(1-144 aa)の測定を行い、各ドメインの反応を詳細に検討した。さらに EL222 と DNA との混合溶液での測定を行い、タンパク質の反応に加えて DNA との結合ダイナミクスの検出を行った。EL222 と結合する DNA 配列は文献[2]を参考に決定し、認識配列を含む 20 塩基対の DNA をタンパク質と等量混合した条件で測定を行った。

【結果と考察】

図2にDNAを含まない場合のEL222全長タンパク質のTG測定の結果を示す。格子波数を変えて測定した結果、分子拡散信号の現れる時間スケールが変化するとともに、数百ミリ秒程度の反応速度で分子拡散係数の減少を伴う反応が観測された。反応物および生成物の分子拡散係数はそれぞれ $D_{\text{反応物}}=10 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $D_{\text{生成物}}=5.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ であると見積もられた。反応物の拡散係数はモノマー構造の拡散係数として妥当なものである。またこの反応速度はサンプルの濃度に依存することが分かった（図3）。これは拡散係数変化を伴う反応が多分子反応であることを示しており、これらの結果からEL222はDNA非存在下でも光依存的なダイマー形成反応を起こすことがわかった。またLOVドメインのみからなるサンプルについても同程度の反応速度で拡散係数の減少（会合反応）が観測されたため、LOVドメインが光依存的なダイマー化サイトとして機能していることがわかった。

次にEL222全長タンパク質とDNAとの混合系でTG測定を行った（図4）。DNAを加えることにより、EL222で観測されたダイマー化反応が起こる前の時間スケールにおいても拡散係数の減少が観測された。これはDNA存在下ではEL222のモノマーとDNAが早い時間で結合する、あるいはEL222のダイマー化反応の速度が加速することを示しており、現在、様々なモデルを用いてDNAとの相互作用ダイナミクスを解析している。討論会ではこれらの結果を基に反応ダイナミクスという観点からEL222が機能する仕組みを議論する。

【参考文献】

- [1] A. Nash et al. *PNAS* 2011, 108, 9449-9454
- [2] G. Rivera-Cancel et al. *Biochemistry* 2012, 51, 10024-10034
- [3] L. Motta-Mena et al. *Nature chemical biology* 2014, 10, 196-202

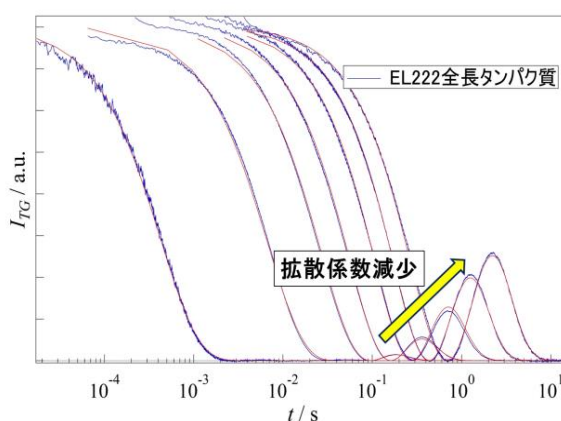


図2. 全長EL222のTG信号

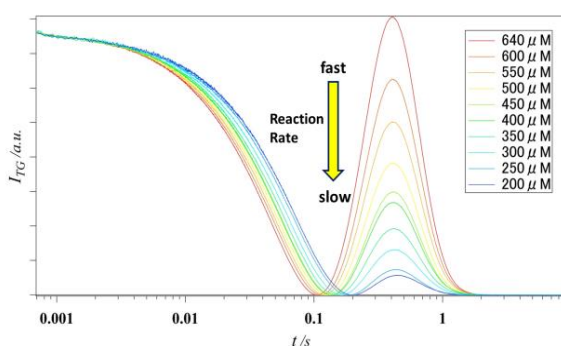


図3. 全長EL222反応速度の濃度依存性

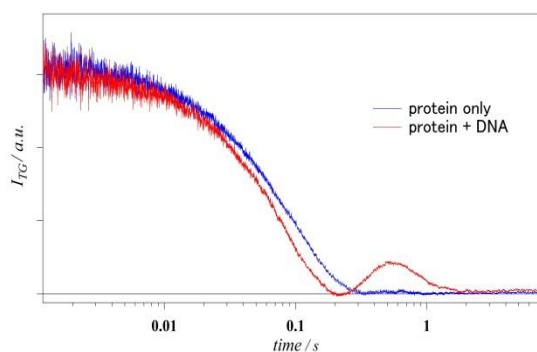


図4. DNA存在・非存在下でのTG信号