

光依存的な DNA 結合タンパク質 EL222 の 光刺激構造変化のダイナミクス

○高門 輝, 中曽根 祐介, 寺嶋 正秀
(京大院 理)

Photo-induced reaction dynamics of 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、光励起されたタンパク質がその構造を変化させ、下流分子との会合状態の変化を引き起こすことにより種々の生理機能を制御している。この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)と DNA 結合ドメイン(HTH)からなるタンパク質である[1]。暗状態でモノマー構造を持つ EL222 は、青色光を照射するとタンパク質の三次構造が変化し、ダイマー化することで特異的認識配列を含む DNA と結合し、下流配列の転写を促進する (図 1) [1,2]。EL222 の生理的機能として、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活かして、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]、EL222 は基礎研究・応用研究両面から注目されているタンパク質である。本研究では、そのシグナル伝達機構を明らかにするため、光励起された EL222 が構造変化を起こして会合状態を変化させる反応、およびそれに伴い DNA と結合力が変化する過程を時間分解検出することを目指した。

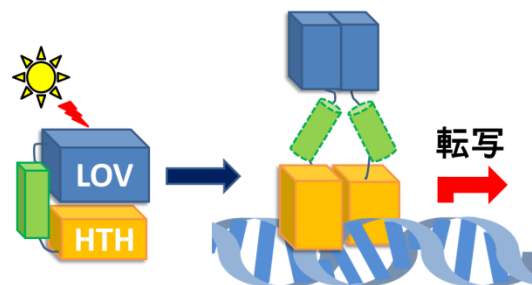


図 1. EL222 の反応モデル

【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。反応ダイナミクス検出には主に過渡回折格子法(TG法)を用いて、反応に伴う構造・会合状態変化を屈折率および分子の拡散係数の時間変化として検出した。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 溶液での測定を行い、EL222 タンパク質の光反応を検出した。さらに EL222 と DNA との混合溶液での測定を行い、タンパク質と DNA の結合ダイナミクスの検出を行った。EL222 と結合する DNA 配列は参考文献[1]を基に決定し、認識配列を含む 45 塩基対の 2 本鎖 DNA をタンパク質と混合して測定を行った。

【結果と考察】

タンパク質の二量体形成反応

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。拡散信号の時間発展を解析することで、数百ミリ秒程度の反応速度で拡散係数の減少を伴う反応が光誘起されることがわかった。反応物および生成物の分子拡散係数はそれぞれ $D_{\text{反応物}}=9.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ および $D_{\text{生成物}}=5.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と見積もられた。反応物の拡散係数として得られた値は、EL222の暗状態での結晶構造（モノマー構造）

の拡散係数として妥当なものである[1]。タンパク質濃度を変えて同様の測定をしたところ、拡散係数変化の速度がタンパク質濃度に比例することが分かった。これはダイマー化反応が拡散係数減少の要因であることを示している（二次の反応速度定数: $k = 4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）。また拡散係数の減少度合いが二分子間の会合では説明できないほど大きいことから、ダイマー化反応に加え、タンパク質の構造変化も光誘起されることがわかった。以上、本研究では初めてEL222の光依存的な構造変化および二量体形成反応を時間分解検出することに成功した。

タンパク質とDNAとの結合反応

EL222全長タンパク質とDNAとの混合系でのTG信号の測定を行ったところ、DNA存在下ではTG信号強度に大きな増大がみられた（図3）。この信号強度はDNA濃度に依存して増大することがわかり、タンパク質とDNAとの光依存的な会合反応を拡散係数の減少として捉えたものと同定された。また、この信号強度の増大はDNA結合ドメインを含まない試料（LOVドメインのみ）とDNAとの混合時には

観測されなかったことから、DNA結合ドメインとDNAとの特異的な結合を捉えたものと考えられる。これらの信号の解析により、タンパク質とDNAとの結合速度を見積もったところ（ $k' = 7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ）、その値がEL222の二量体形成速度よりも速いことがわかった。このことよりEL222はDNAと結合したのち、二量体化反応を起こすという反応スキームが提唱される。これらの結果を基にEL222の構造変化・会合状態変化およびDNAとの結合反応のダイナミクスについて議論する。

【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

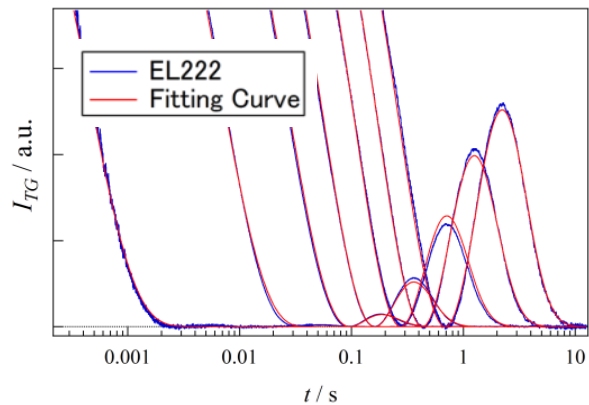


図2. EL222タンパク質のTG信号

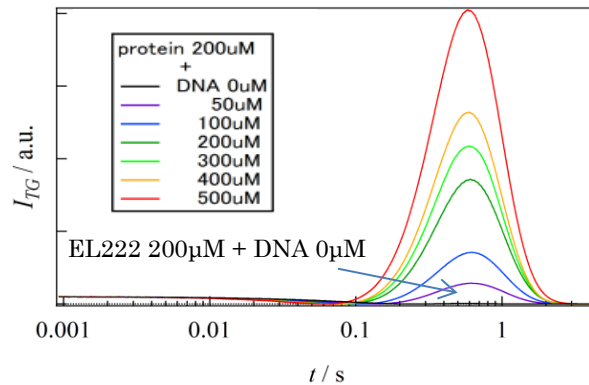


図3. EL222+DNA混合系のTG信号