

## ストップフローと過渡回折格子法を組み合わせた 蛋白質反応検出法

<sup>1</sup>京大院理

○中曽根祐介<sup>1</sup>, 宝本俊輝<sup>1</sup>, 寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Time-resolved study of protein reactions using the transient grating method combined with a stopped-flow apparatus

○Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Shunki Tarakamoto<sup>1</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

**【Abstract】** The transient grating (TG) method is a unique and powerful technique to study the reaction dynamics of protein from the view point of diffusion coefficient ( $D$ ) change.<sup>1</sup> In order to detect the TG signal, however, the reaction must be triggered by light, and consequently, the target had been limited to photosensor proteins. In this study, we combined the TG method with stopped-flow technique to expand the number of target molecule. In order to optimize the system (e.g. mixing efficiency, time resolution, sample consumption), we have developed a new stopped-flow apparatus utilizing a microchannel mixing cell. Using this system, we can monitor the protein reactions with only 2  $\mu$ l sample consumption for a mixing. Additionally, we labeled proteins with a photochromic compound to detect the TG signal and succeeded in detection of  $D$  change upon mixing of two solutions. We will present the detail of the system and application to protein reactions at the conference.

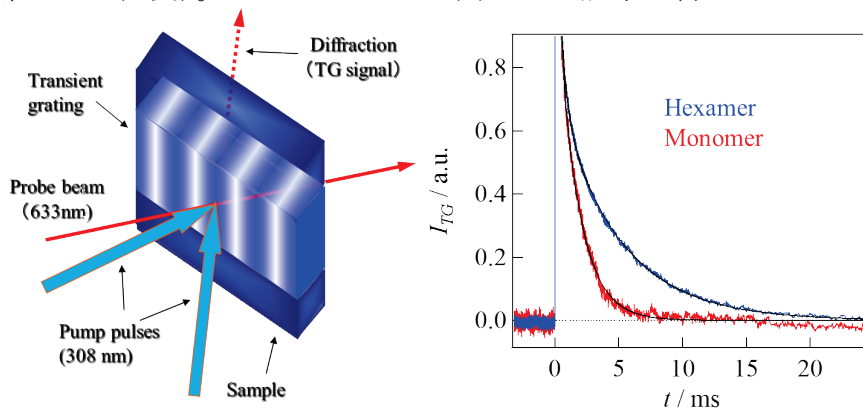
**【序】** 過渡回折格子 (TG) 法を用いることで、吸収変化では捉えきれないタンパク質の構造変化や分子間反応を、拡散係数変化という観点から高感度に時間分解検出できる<sup>1</sup>。しかし、その原理上、光で反応を駆動できる対象にのみ適用可能であったため、測定対象は光センサー蛋白質に集中していた。そこで我々は、研究対象の飛躍的な拡大を目的とし、ストップフロー (SF) 法と TG 法を組み合わせた新規手法 (SF-TG 法) の開発に取り組んだ。つまり溶液混合により反応を開始し、その後のタンパク質ダイナミクスを TG 法により高感度に検出することがねらいである。これにより酵素反応やタンパク質複合体の離合集散過程、シグナル伝達反応やフォールディング反応など様々な系に適用可能な新規手法が誕生する。ただし、TG 信号を得るためには光に反応する目的分子が必要であり、また高速混合後の乱流が残っていると拡散係数を正確に決定できない。本研究では、これらの問題点を克服し SF-TG を実用化するために、ストップフロー装置を新規に開発し、光反応性の無いタンパク質から TG 信号を得るための工夫を行った。本討論会では技術開発の詳細に加え、実際にタンパク質の集合反応 (時計タンパク質 KaiC のヘキサマー形成反応) を捉えた例を報告する。

**【方法】** SF-TG 法の実用化に向けて取り組むべき課題は以下の 3 点である。

- ① サンプル消費量の低減：一回の混合に要するサンプル量を極限まで抑える。
- ② 時間分解能の向上：溶液の高速混合により生じる乱流を短時間で止める。
- ③ S/N 比の高い TG 信号の取得：光反応性分子でタンパク質をラベルする。

これらの課題を達成するために、まずストップフロー装置を独自に開発し、マイクロ流路を用いた溶液混合を行った。混合部および測定窓を小型化することで一度の測定に要するサンプル量を約  $2\ \mu\text{l}$  に抑えることに成功した（市販の装置： $200\ \mu\text{l}$  程度）。また素早く乱流を止めるために、応答速度の高いバルブを配置して流路の開閉を高速制御するシステムを立ち上げた。これにより、TG 測定におけるデッドタイムが  $70\ \text{ms}$  まで改善した（市販の装置： $1\ \text{s}$  程度）。さらに S/N 比の高い TG 信号を得るためにフ

ォトクロミックな分子であるスピロピランでタンパク質をラベルし、紫外光励起に伴う吸収スペクトル変化を利用して TG 信号を得ることに成功した。Fig.1 に TG 法の概略図（測定波長）およびスピロピランでシアノバクテリア由来の時計タンパク質 KaiC をラベルして実



際にて得られた TG 信号を示す（モノマー（赤）とヘキサマー（青）の分子拡散信号）。

【結果・考察】 KaiC は ATP 非存在下ではモノマーとして、ATP 存在下ではヘキサマーとして存在する。Fig.1 に示したようにモノマーとヘキサマーは異なる拡散係数を持つことがわかった ( $D_{monomer} = 8.8 \times 10^{-11}\ \text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{hexamer} = 3.7 \times 10^{-11}\ \text{m}^2/\text{s}$ )。そこで、モノマー-KaiC と ATP を高速混合し、その後の拡散係数変化を捉えることで、ヘキサマー形成ダイナミクスの検出を行った。Fig.2(left) に高速混合後の遅延時間を変えて測定した TG 信号を示す。

遅延時間を長くするほど、拡散信号の減衰速度が遅くなる様子が観測されたが、これはヘキサマーの形成過程を捉えていることに他ならない。各遅延時間で得られた拡散係数をプロットすると Fig.2(right)

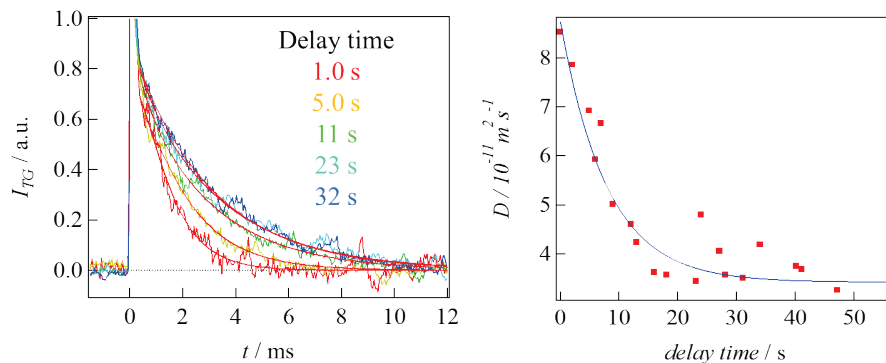


Fig.2 (left) TG signals obtained at several delay times. (right)  $D$  value against delay time.

のような時間変化を示した。一指数関数でよく再現でき、得られた時定数は  $7.9$  秒であった。Fig.3 にヘキサマー形成過程のスキームを示す。

KaiC はモノマーがアグリゲーションしやすく、きれいな信号が取れていないため、現在はモノマーを安定化する条件下で再実験を行っている。KaiC 複合体の離合集散はヘキサマー間でのモノマーユニットの交換反応に重要と考えられており、本研究で得られた知見はそのダイナミクスを知る手がかりになると期待される。

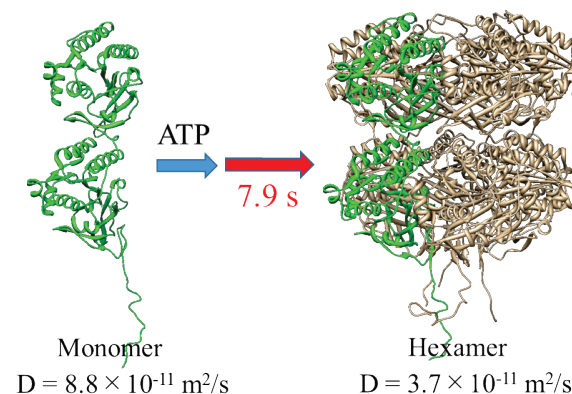


Fig.3 Reaction scheme of hexamer formation of KaiC

【参考文献】 [1] M, Terazima. *Phys Chem Chem Phys*. **13**, 16928 (2011).