

近紫外光による光開裂タンパク質の開裂・解離反応ダイナミクス

京大院理

○生駒 美里, 中曾根 祐介, 寺嶋 正秀

Dynamics of the near-UV-light-induced peptide backbone cleavage and dissociation of photo-cleavable protein

○Misato Ikoma, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima
Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

【Abstract】Photo-cleavable protein (PhoCl), which is an engineered protein from mMaple (a kind of photo-convertible fluorescent protein), shows a near-UV-light-induced peptide backbone cleavage around its chromophore and a following spontaneous dissociation into two fragments. PhoCl exists as a green fluorescent form (Ex 490 nm, Em 505 nm) in the ground state. Upon UV light illumination, a transient red fluorescent form (Ex 566 nm, Em 583 nm) is produced (photo-conversion), and the red fluorescence ceases with the following dissociation. Here, we studied this light-induced cleavage and dissociation reaction by the transient grating (TG) method. TG signal shows that PhoCl undergoes a significant increase of the diffusion coefficient (D) upon photoexcitation, which has been tentatively assigned to a D change associated with the dissociation. Static measurements of accumulation of the dissociated form indicate the rate of dissociation is much slower than the photo-conversion (cleavage) process.

【序】GFP に代表される蛍光タンパク質(FPs)は、生体分子に遺伝学的に付加できる蛍光プローブとして主にバイオテクノロジーの分野で広く用いられている。FPs にはさまざまな蛍光特性を持つ分子が知られているが、その中でも、Kaede, Dendra2 などのサンゴに由来する光変換型蛍光タンパク質(pcFPs)は、近紫外光照射によって発色団付近でペプチド骨格の開裂を生じ、緑色から赤色へと不可逆的に蛍光波長を変化させるという特徴を持つ。2017年に、pcFPs の一種である mMaple[1]の改変体として、光開裂タンパク質(photo-cleavable protein, PhoCl)が報告された[2]。このタンパク質は、pcFPs と同様に近紫外光照射により発色団付近で開裂し、緑から赤への光変換を生じたのちに、タンパク質が自発的に二断片に解離して蛍光を失う(Fig.1)。PhoCl はペプチド断片の不可逆的な解離を生じるという点で他に例のない光反応を示しており、光遺伝学への応用などが大いに期待される。本研究では、吸収測定および過渡回折格子法(TG法)を用いて、PhoCl の光照射による解離反応を時間分解で検出することで、開裂・解離反応の詳細なダイナミクスを明らかにすることを目的とした。

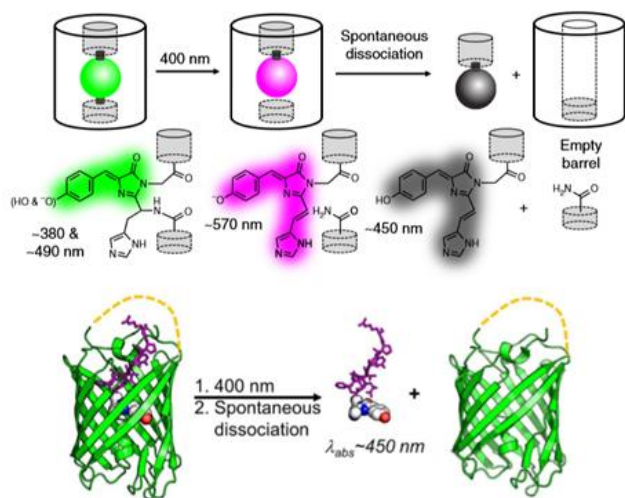


Fig.1. Expected reaction scheme of PhoCl [2]

【方法】 サンプルは、先行研究[2]で示された PhoCl (27 kDa)の C 末端側に 8 kDa の linker を加えたもの(PhoCl-linker, 35 kDa)を用いた. 吸収測定では励起光に中心波長 380 nm の LED を用いた. TG 測定では、励起光に 355 nm のナノ秒パルスレーザー、プローブ光に 633 nm の CW レーザーを用いた.

【結果・考察】 PhoCl の発色団はプロトン化状態および非プロトン化状態の平衡にあり、前者が 385 nm、後者が 490 nm に吸収極大を持つ. 光開裂・解離反応は、プロトン化状態の分子種を励起することによってのみ生じることが知られている[1].

Fig.2 に時間ゼロで UV-LED の照射を開始した後の吸収変化を追跡した結果を示す. 複数波長での吸光度変化をグローバル解析したところ、三成分($\tau_1 = 8.5 \times 10^2$ s, $\tau_2 = 1.5 \times 10^3$ s, $\tau_3 = 3.7 \times 10^3$ s)で再現できた. このうち、565 nm の吸収変化は τ_1 , τ_2 の二成分で再現でき、 τ_1 が 565 nm に吸収を持つ過渡的な中間体の生成、 τ_2 がその減少に対応する. これは、前者が光変換 (開裂)、後者が解離を反映すると推定される. また、565 nm 以外の吸収変化を再現するためには、時定数 τ_3 が必要であり、PhoCl の反応には開裂・解離以外の要素が存在することが示唆された.

UV パルス励起によって得られた PhoCl-linker の TG 信号を Fig3 に示す. 熱拡散信号に加えて、拡散係数の変化によって形成される山型の分子拡散信号が観測された. 解析により 3 成分の拡散が含まれていることがわかり、反応物 (二種類) および生成物の拡散係数は $D_{R1} = 8.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_{R2} = 1.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, $D_P = 14 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と見積もられた. この解析においては D_{R1} は GFP の拡散係数を参考に PhoCl-linker の拡散係数の予想値で固定した[3]. D_{R2} は PhoCl-linker の多量体の拡散係数と考えられ、サイズ排除クロマトグラフィーによりその存在を確認している. D_P は解離により生じた断片の拡散係数として妥当である. 以上から、PhoCl はモノマーと多量体間の平衡にあり、拡散係数変化は解離反応を捉えたものと考えられる. 一般に pcFPs の光変換の量子収率は非常に低いため、これまででは励起状態ダイナミクスの検出にとどまっていたが、TG 法により解離反応を検出可能であることが示された. 今後は多量体を除いた試料の測定を達成し、解離反応の速度についてより詳細な解析を行う予定である.

【参考文献】

[1] Ann L. McEvoy *et al.*, *PLoS One*. 2012;7(12):e51314. [2] W Zhang *et al.*, *Nat Methods*. 2017 Apr;14(4):391-394. [3] M Arrio-Dupont *et al.*, *Biophys J*. 2000 Feb;78(2):901-7.

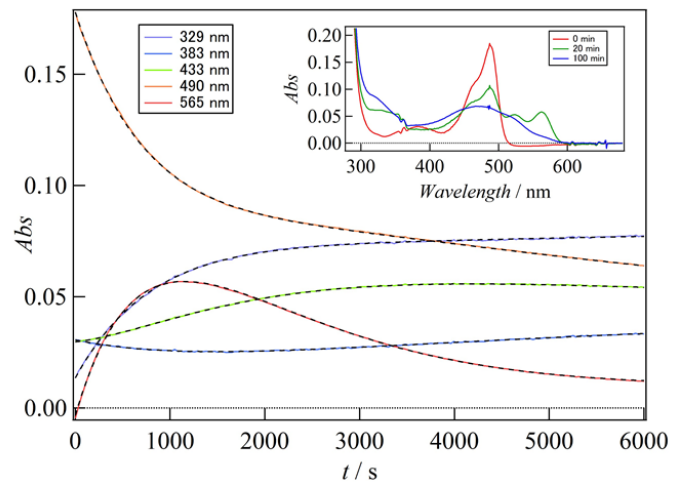


Fig.2. Change of absorbance upon UV-light illumination

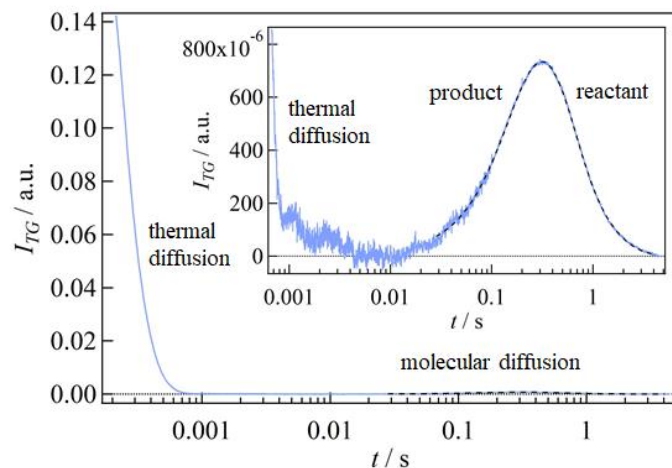


Fig.3. Typical TG signal of PhoCl