

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20107003

研究課題名(和文) エネルギー・構造揺らぎの時間分解検出法開発と反応機構

研究課題名(英文) Development of time-resolved methods for detections of energy and structural fluctuations, and revealing relationship between fluctuation and reaction mechanism

研究代表者

寺嶋 正秀(Terazima, Masahide)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00188674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 143,700,000円、(間接経費) 43,110,000円

研究成果の概要(和文)：過渡回折格子法を用いることで、揺らぎと生体分子の機能との関係を明らかにしてきた。例えば、揺らぎが大きいと考えられるループ領域が、機能に関係した反応に重要と思われる例を見出した。また、体積揺らぎと関係する圧縮率の時間分解測定のために、新規な高圧システムを設計・作製することに成功した。青色光センサータンパク質の中間体の体積揺らぎを検出し、構造揺らぎのダイナミクスが、初めて捉えられるようになった。また、熱容量や熱膨張係数の時間分解測定を行うことでも、体積揺らぎが増大している証拠を得ることができた。一分子検出によるFRET信号を解析する新しい手法を開発し、テロメア構造の揺らぎを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Relationship between fluctuation and biological function has been elucidated by the time-resolved transient grating method, which has been developed in our group. By using this technique, we successfully discovered that the flexible loop region of a blue light sensor FKF1 is important for the function. The volume compressibilities of reaction intermediates of PixD were measured and demonstrated that the fluctuation is indeed enhanced during the reaction. Time-resolve heat capacities and thermal expansion coefficients were also measured for reaction intermediates which were directly related with the function. A new analytical method of a single molecular detection has been developed for obtaining high time resolved information of the fluctuation.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：揺らぎ 生体分子 反応 機能 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

生体分子の反応の中で特にタンパク質 - 基質の反応性においては「鍵と鍵穴説」が非常に有名であり、高校の化学の教科書にも記載されているし、また現在でも多くの研究者がそれに基づいた議論をすることが多い。これはタンパク質は形がちゃんと決まっているものであり、反応はそれにあつた形の物質に対して起こるという考えである。しかし、生体分子はその機能する水中においては本質的に非常に大きく揺らいでいることがシミュレーションなどで明らかになっているし、水を少なくしてその揺らぎを取り除くと反応が起こらなくなることがある。つまり揺らぎは反応やそれに結びつく機能にとって本質的なものであり、このような反応と揺らぎの相関を普遍的に解明することは、タンパク質の機能制御の分子科学的本質を解明することにつながり、緊急に解明すべき問題と言える。しかし、まだ実際の反応において揺らぎがどう関わっているのかという問題を直接観測で検討した例はほとんどないし、本当に反応中間体で揺らぎの増大が起こっているのかと言う実験的検証もほとんどなされていないのが現状である。こうした状況の下で、申請者はこれまで分子科学の分野で反応途中の熱力学量を時間分解で検出する手法の開発に取り組んでいた。例えば、超高速の発熱検出、温度一定下でのエンタルピー変化ダイナミクス、圧力一定下での部分分子容変化ダイナミクス、反応中間体の熱容量変化などを時間分解で検出する事に、世界で唯一、申請者のグループが成功している。熱力学量と揺らぎとの理論的相関を考えれば、こうした申請者独自の手法を、生体分子の機能と揺らぎと言う非常に検出の困難な分野に適用する事が可能であると思われる。

2. 研究の目的

本申請においては、これまで培ってきた実験手法を、生体分子の揺らぎ検出に適用できるように形で確立し、また新しい視点からの時間分解揺らぎ検出法を提案する事と、こうした手法を実際に機能するできるだけ多くのタンパク質反応に適用する事で、機能に関係する反応と揺らぎとの関わりとその一般性を明らかにすることを目的とした。特に、反応途中で本当に揺らぎが増大しているのか、しているとすればそれはどういう部分で、それが構造変化とどう関係するのか、揺らぎ増大と反応性との相関はどうか、その分子論的原因はどこにあるのか、などその揺らぎと機能との関係を明らかにすることを目標とする。

このために、実験手法の確立とそれを用いた生体系への展開を行う。例えば、過渡回折格子(TG)法を用いることで、熱容量変化や熱膨張係数の時間分解検出をこれまでに成功しており、こうした物理量は、エネルギー揺らぎや構造(部分分子容)揺らぎとエネルギー

揺らぎの相関を表す指標と考えられているが、実験的検証はまだ乏しいのが現状である。そのため、まず実験的にこうした熱力学量と揺らぎとの相関を明確にする研究を行う。更に、構造(部分分子容)揺らぎを直接的に表す時間分解圧縮率の測定装置を完成させる。このためには、種々の圧力下で精密にしかも定量的に熱力学量を測定できる TG システムが必要となる。また、これまでの研究成果を通して、タンパク質の構造揺らぎと拡散係数の間には相関があるらしいという「感触」を得ている。これはおそらく分子間水素結合と分子内水素結合の差を表していると考えられるが、この相関関係を確立することができれば、新しい視点からの揺らぎ検出が可能となるため、この相関関係を検討する。

また、TG 法以外でも、一分子検出はアンサンプル系では隠される揺らぎを直接観測できるという意味で、その適用限界はあるものの、揺らぎの検出に対して有力な手法となりうる。蛍光検出による FRET 法による 1 分子検出により、DNA やタンパク質構造揺らぎを高時間分解能で検出する手法の開発も進め、一分子検出の高時間分解能追及を行う。

3. 研究の方法

揺らぎをどのように抽出するかという手法の確立と、広範な生体反応系への展開の道筋をつける。時間分解揺らぎ検出のための一つの手法は、過渡回折格子(TG)法を用いた時間分解熱力学法を基礎とするものである。この手法の原理と解析法は、これまでの研究で実証しているが、熱力学量ダイナミクスを十分な精度で測定することは簡単ではない。それは、TG 実験は光学系のアライメントに非常に敏感であり、ほんの少しの温度変化やサンプルのゆれ、レーザー光のゆれに対して強度が変化するためである。特に蛋白質の研究における水溶液の場合には、水の屈折率が温度に対して変化するために、必須である熱参照試料との比較がより困難になる。これを克服するために、幾つかのシステム上の改良を行う。例えば、1つの石英セルを2つの部分に分割することで、2つの溶液をまったく同条件で比較できるシステムを作成し、安定した測定を行えるようにする。また、構造揺らぎを反映する等温圧縮率を時間分解するためには、時間分解体積変化の圧力依存性を用いるが、新規な高圧システムを設計・作製する。生体系に適用する際に問題となるのが、感度とプローブ波長であるが、赤外光をプローブとした検出方式も試みる。

こうしたシステムを確立していく一方で、一般性を見出すために、反応中間体の揺らぎと反応性との相関を広範に明らかにする。このための対象として、種々のタンパク質を予定している。例えば、植物の光センサーである、フォトトロピンやクリプトクロム、ファイトクロム、オーレオクロムなど、また原核

生物の持つアナベナセンサリーロドプシンや PixD、AppA、YcgF、エネルギー変換の重要な分子として大きな興味をもたれている光合成中心タンパク質などである。例えば、フォトトロピンをモデル系にして、その反応と揺らぎと機能の関係について検討を開始する。このタンパク質が興味深いのは、LOV ドメインという多くの蛋白質が持つ共通なセンサードメインの情報が、どのようにして生理活性を受け持つドメインに移されているかと言う点である。我々の研究結果も含めて、現在まで、こうした共通ドメインに大きな構造変化は観測されていない。ではどうやって生理活性のある遠くの部分に情報が移されるのか。申請者は、中間体の揺らぎが別のドメインの構造変化を誘起しているという仮説を持っている。この仮説を、検討する。

4. 研究成果

種々の研究成果が得られているが、いくつかの例を以下に挙げる。

生体分子構造には比較的構造が硬い領域と、X線結晶構造でもあまり見えないような揺らぎが大きい領域が存在する。揺らぎが大きいと考えられるループ領域が、機能に関与した反応に重要と思われる例を、FKF1 と呼ばれる青色光センサータンパク質の反応に見出した。FKF1 は、植物の持つ青色光センサーであり、日照時間によって開花を調整する働きを持つ。このタンパク質は、LOV ドメイン、F-box ドメイン、Kelch repeat ドメインからなり、タンパク質間相互作用によってユビキチン化や日照時間の長さを感じ取るタンパク質を調整する働きを持っている。発色団 FMN の光励起後、数マイクロ秒で発色団である FMN とタンパク質部分との間で共有結合が作られ、後続反応を誘起することが知られている。この後続反応過程について、過渡回折格子(TG)法を用いて調べ、反応スキームを決めることに成功した。特に、拡散係数変化を起こす非常に大きな構造変化を時間分解で検出することに成功したことは大きな成果である。更に FKF1-LOV のループ領域が欠損した変異体を作成し、光反応を観測したところ、ほとんど拡散係数変化を起こさないことが分かった。これまでの我々の研究によって、この拡散係数変化ダイナミクスは、機能と関係したタンパク質反応とよい相関を持っていることが分かっているので、このことは揺らぎの大きなループ領域の構造変化が FKF1 の機能に関与した反応に必須であることを示しているよい例と思われる。

また、体積揺らぎと関係する圧縮率の時間分解測定のために、時間分解体積変化の圧力依存性を用いた、新規な高圧システムを設計・作製することに成功した。この装置を用いて青色光センサータンパク質 PixD の反応を調べた。PixD は常温性シアノバクテリアの走光性の制御に関わる青色光センサータンパク質である。光受容のために発色団として

フラビンを結合する BLUF (sensors of Blue Light Using Flavin) ドメインを持ち、その構造や光反応機構が近年多くの興味を集めている。TG 信号は、体積変化を表す成分と分子拡散を表す成分に分割できることが常圧での実験・解析からわかっている。まず PixD の拡散信号について、その圧力効果を調べたところ、タンパク質の構造変化する分子種の割合が、大きく圧力の影響を受けることが明らかとなった。また、その反応量子収率も圧力変化し、この圧力効果を通して、反応中間体同定などの新規な情報を得ることができた。次に 40 マイクロ秒程度で体積膨張過程を表す信号の圧力依存性から中間体の体積揺らぎを、基底状態からの差として検出した。これより光励起直後に生成する吸収スペクトルシフトを起こした中間体は大きな揺らぎを持つことが分かった。この結果を、我々は光励起により誘起された大きな揺らぎが、光反応を推進する駆動力になっていると解釈した。このようにして、タンパク質の構造揺らぎが反応過程においてダイナミックに変化する様子が、初めて捉えられるようになった。また、熱容量や熱膨張係数の時間分解測定を行うことでも、反応中間体におけるエネルギーや体積揺らぎが増大している証拠を得ることができた。こうした結果は、まさに揺らぎが機能に関与する反応と密接に関係していることを示すものであり、反応途中でエネルギーが不安定になり、構造が緩み、その結果反応が進行していることをうかがわせるものである。

さらに興味深いことに、励起のための光強度を増加させていくと、信号の形が劇的に変化することが見出された。信号の解析から、反応物が PixD の 10 量体、生成物が PixD 二量体として同定されており、この励起強度依存性は、10 量体のうち複数個が励起されるとはじめて解離反応が起こることを意味する。すなわち、解離するのは従来考えられていた PixE の存在のためではなく、PixD 自体の性質であることを示している。また、M93A 変異体では、WT で観測された体積変化や拡散係数変化が観測されなかったことから、解離に重要な変化は Met93 残基およびこれを含むループ領域の構造変化、あるいはその領域での揺らぎ増大で起こっていることが示された。

次に、より生体反応に関与する PixD₁₀-PixE₅ 複合体の反応を検討した。この時間スケールでの信号の立ち上がりと減衰は、それぞれ生成分子と反応分子の拡散信号であることが格子波数を変化させた実験により示された。この解析より、PixD₁₀-PixE₅ の反応は PixD 二量体と PixE 単量体に解離するとわかった。励起光強度を変化させて測定して、反応は 2 量体励起で起こっていることがわかった。このことは、PixD は単なる光センサーではなく、光強度センサーと呼ぶべきものであることを示す。

一方で別の光センサータンパク質の反応

への揺らぎの効果についても検討した。フォトトロピン(Phot)は、多くの植物が持つ代表的な青色光センサータンパク質である。Photは、LOV ドメインと呼ばれる光受容を担うドメインを2つ有している。その光反応は多くの興味を集め、詳細な研究がなされてきた。それによると、発色団 FMN の光励起後、数マイクロ秒で FMN とタンパク質部分との間で共有結合が作られ、その後約 100 マイクロ秒ほどで、LOV に疎水結合でついているリンカーと呼ばれるヘリックス構造をもった部分が LOV から解離する。その解離に続いて、数ミリ秒でそのヘリックス構造が壊れ、それによって C 末にあるキナーゼドメインが活性化し、生理学的な機能を発揮する。この活性状態は数分続き、その後 FMN とタンパク質の間の共有結合が解裂して元の不活性状態へ戻る。この一連の機能に関する反応の中で、機能を持つ方向への順反応については FMN やタンパク質構造変化も含めて多くの研究がなされて来ているが、不活性になる過程については発色団の吸収変化による戻り反応が分のオーダーの時間分解で調べられているだけであり、構造変化についての知見は全くなかった。タンパク質構造は、共有結合が切れるのと同時に素早く元に戻るのであろうか、LOV ドメインからリンカーが解離する過程には揺らぎ増大が関与している可能性があるが、その揺らぎはすぐに収まる(静まる)のであろうか。こうした疑問に答えるため、この逆反応過程について、構造変化を時間分解で調べることのできる過渡回折格子(TG)法を用いて調べた。TG 法を逆反応に適用するために、我々が以前に開発していた 2 段階起 TG 測定法を用いた。逆反応と順反応の TG 信号を解析すると、順反応の信号には数マイクロ秒で共有結合が生成する過程が立ち上がりとして観測されるが、逆反応には見られない。これは共有結合解裂がピコ秒の早い時間スケールで完了していることを示している。ミリ秒領域での構造変化を表す信号は両過程で似ているが、詳細な解析によると屈折率変化の符号が逆であり、順反応ではヘリックスの崩壊が、逆反応ではヘリックス生成が観測されていることが分かった。更に、逆反応の信号の時間変化を測定し、このヘリックス形成速度を求めたところ、10 ミリ秒ほどと Unfolding 過程よりも遅いものであった。ヘリックス形成速度は種々のポリペプチドで報告されており、サブマイクロ秒から数マイクロ秒で完了することがほとんどである。実験前には Phot のヘリックスもこれらの速度で巻き戻るものと予想していたが、結果は4桁以上遅いものであった。これは LOV ドメインがヘリックスのテンプレートとして働いており、まさに揺らいでいる変性タンパク質が折り畳まれる過程を再現していると考えられる。

これらのセンサータンパク質以外の反応でも、機能と拡散係数の変化との間により相

関がみられ、揺らぎと拡散係数との相関を考えれば、揺らぎの程度と機能とは相関していることを示していると結論付けられる系が多数あることを見出している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 59 件)

Time-Resolved Tracking of Interprotein Signal Transduction: Synechocystis PixD-PixE complex as a Sensor of Light Intensity, K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, 134, 8336-8339(2012). 査読有, DOI: 10.1021/ja301540r.

Light-induced conformational change and product release in DNA repair by (6-4) photolyase, M. Kondoh, K. Hitomi, J. Yamamoto, T. Todo, S. Iwai, E. D. Getzoff, M. Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, **133**, 2183-2191(2011). 査読有, DOI: 10.1021/ja107691w.

A way to sense light intensity: multiple-excitation of the BLUF photoreceptor TePixD suppresses conformational change, K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, *FEBS Lett.*, **585**, 786-790(2011). 査読有, DOI: 10.1016/j.febslet.2011.02.003.

Photoreactions of Aureochrome-1, T. Toyooka, O. Hisatomi, F. Takahashi, H. Kataoka, M. Terazima, *Biophys.J.*, **100**, 2801-2809(2011). 査読有, DOI: 10.1016/j.bpj.2011.02.043.

Light-Induced Conformational Change and Transient Dissociation Reaction of the BLUF Photoreceptor Synechocystis PixD (Slr1694), K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, *J.Mol.Biol.*, **409**, 773-785(2011). 査読有,

DOI: 10.1016/j.jmb.2011.04.032

Transient dissociation of the transducer protein from Anabaena sensory rhodopsin concomitant with formation of the M state produced upon photoactivation, M. Kondoh, K. Inoue, J. Sasaki, J. Spudich, M. Terazima, *J.Am.Chem.Soc.*, 133, 13406-13412(2011). 査読有,

DOI: 10.1021/ja202329u.

Temperature sensitive reaction of a photosensor protein YcgF: Possibility of a role of temperature sensor, Y. Nakasone, T. Ono, A. Ishii, S. Masuda, M. Terazima, *Biochemistry*, **49**, 2288-2296(2010). 査読有,

DOI: 10.1021/bi902121z.

〔学会発表〕(計 266 件)

光センサー蛋白質フォトリポンの活性状態における構造揺らぎの評価, 中曽根 祐介, 岡島 公司, 徳富 哲, 寺嶋 正秀, 分子科学討論会、東京、2012 年 9 月 18 日 21 日

Time-resolved detection of protein-protein interaction, M.Terazima, 8th European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, Aug. 23-27, 2011

Spectrally silent photochemistry is important for biological reactions, M.Terazima, Gordon Research Conference on Photochemistry, Easton, USA, July 10-15, 2011

A strange reaction of a photosensor protein: PixD, M.Terazima, Third Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences, Jeju, Korea, Feb.26 - March 1, 2011

〔図書〕(計 6 件)

揺らぎと生体機能総論, 寺嶋正秀、揺らぎと生体機能、寺嶋正秀監修、メディカルバイオ別冊、オーム社、6-9(2010)

生体分子の反応中の揺らぎをとらえる分子科学手法, 寺嶋正秀、揺らぎと生体機能、寺嶋正秀監修、メディカルバイオ別冊、オーム社、10-16(2010)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺嶋 正秀 (TERAZIMA MASAHIDE)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00188674

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：