

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13623

研究課題名(和文)新規拡散係数測定装置の開発および生体分子反応ダイナミクスへの応用

研究課題名(英文) Development of a novel technique for diffusion measurement and its application to the reaction of biomolecule

研究代表者

中曽根 祐介 (Nakasone, Yusuke)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：00613019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生体分子の高次構造をよく反映する拡散係数という物理量に着目し、その時間分解検出法の開発を行った。ストップフローシステムの開発を行い、過渡回折格子法と組み合わせることで様々なタンパク質の反応検出に適用可能なシステムを構築した。スリット状の溶液噴射を利用した拡散測定法も立ち上げたが、乱流の発生により観測したい自由拡散計数の安定な計測は達成できなかった。しかし上記システムを用いて、時計タンパク質の集合反応や光センサータンパク質の変性反応を時間分解で捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research is to establish a novel technique to study the reaction dynamics of biomolecules from a view point of diffusion coefficient change. Firstly, I have developed a stopped flow system which is optimized for the measurement of protein reaction (small amount of sample consumption, short dead time, high mixing efficiency). Combining this equipment with transient grating (TG) method, we succeeded in detection of assembly process of clock protein and denaturation dynamics of light sensor protein. I also tried to detect the diffusion process utilizing a microinjection from a slit-like pore. Monitoring the change of pattern created by the injection through the intensity change of diffracted light, the diffusion coefficient is expected to be determined. The signal, however, was not reproducible because the free diffusion is disrupted by a turbulence created by the injection. We are in the middle of development of the novel system for diffusion measurement.

研究分野：生物物理学

キーワード：拡散係数 過渡回折格子法 タンパク質反応 時間分解 ストップフロー

1. 研究開始当初の背景

生命機能の仕組みを理解するためには分子レベルでの反応検出が必要不可欠であり、申請者らは拡散係数測定を行うことで、蛋白質の反応ダイナミクスを明らかにしてきた。用いた手法は過渡回折格子(Transient Grating (TG))法であり、二本の励起パルス光で作った干渉縞によって分子を空間特異的に励起し、ここにプローブ光を入れることで得られる回折光強度の時間変化を観測する(図1)。この消失過程から分子拡散の情報が得られ、その時間変化から蛋白質の高次構造や分子間相互作用の変化を時間分解検出できる。拡散過程プローブによる反応研究は過去に例のないものであり、その感度は非常に高い。実際に光センサー蛋白質の会合・解離反応や局所的なループ構造の変化など他の手法では検出が困難な生体分子反応を時間分解で捉えてきた。しかしその原理上、光で反応を開始できる系のみ適用可能であったため、研究対象は光センサー蛋白質に限られていた。一方、従来の拡散係数測定法(動的光散乱・磁場勾配 NMR・蛍光相関分光・テイラー分散)は光反応性を要求しない一方で、測定に長時間を要するため蛋白質反応の実時間検出に適用されることは無かった。

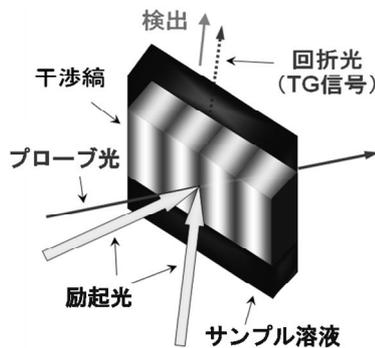


図1: TG法の原理図

2. 研究の目的

本研究では TG 法を発展させ、その測定対象を拡大することを目的とした。具体的にはストップフロー法との融合を行い、高速混合で開始される反応を TG 法で捉えるという技術開発を行った。しかし、市販のストップフロー法はサンプル消費量が多く、またデッドタイムにも問題があった。そこで本課題では独自にストップフローシステムを開発し、測定セルの小型化や流速の高速化などによりハイスpek的なシステムの構築を行った。またサンプル消費量を抑えるためには、一度の混合で S/N 比の高いデータの取得が要求される。そこで従来の TG 法よりも簡便かつ高感度な拡散係数測定手法の開発を目的として溶液噴射により回折格子を形成するシステムの構築を目指した。縞状の多孔スリットから溶媒中に蛋白質溶液を噴射するこ

とで濃度勾配による大きな屈折率変調(回折格子)を形成し、その後の拡散過程を回折光の時間変化として捉えることが可能と考えたためである。こうして独自に立ち上げるストップフローシステムとの融合により、高感度かつ汎用性の高い新規反応検出装置を立ち上げることを目的とした。立ち上げたシステムを用いて、タンパク質の変性反応や集合反応の時間分解検出を行い、その分子機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

ストップフロー装置の開発

実用化に向けてストップフロー装置の開発を行った。サンプル消費量や混合効率を改善する以外に、高速混合後の乱流を素早く停止する工夫が必要である。なぜなら、乱流が残っていると拡散係数を正確に決定できないためである。

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。

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。

これらの課題を達成するために、T 字路型のマイクロ流路を混合部に採用した。さらに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 マイクロリットルに抑えることに成功した(市販の装置：200 マイクロリットル程度)。しかし一般的に、細い流路を流れる流体は層流を形成しやすく、二液の混合は起こりづらい。そこで高効率な混合の実現に向けて、乱流を発生させるべくコンプレッサーおよびプランジャーポンプを配置し、高圧に圧縮した気体を利用することで高速な送液を実現した。その際、混合後に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した。これにより、TG 測定におけるデッドタイム(測定セル内で乱流が収まるまでの時間)が 70 ms まで改善した(市販の装置：1 s 程度)。

光励起型 TG 測定

高速混合後の反応を捉えるために TG 測定を行うが、そのためには光反応する分子でタンパク質をラベルする必要がある。そこで 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 信号を得た。スピロピランは光反応に伴う吸収スペクトル変化が顕著であるため、強い TG 信号を与え、また別の波長の光で可逆的に状態を変換できるため、繰り返し測定が可能であることが大きな利点である。こうしてストップフロー法と従来型 TG 法の融合システムの開発は完了した。

噴射型の拡散測定

格子状のスリットから溶媒中に蛋白質溶液を噴射することで縞状の濃度勾配を形成し、これに伴う屈折率変調（回折格子）をプローブ光の回折光として検出した（図2）。

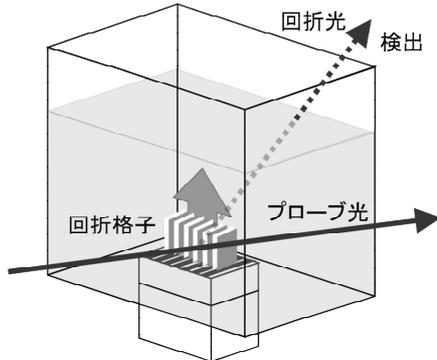


図2: 縞状の溶液噴射による回折光測定

プローブ光 (CW) はブラッグ反射を満たす角度で入射する必要があるが、作製するスリットの格子間隔からその計算は容易である。また検出器の位置決めも同様に行い、ピンホールを用いて回折光以外の漏れ光や散乱光を除去した。つまりバックグラウンドフリーな測定を行うことでS/N比の高い信号検出を達成した。スリットは高圧に耐えうる金属製のものを作製し、流路との接続アダプターもスリットを容易に交換できる仕様で作製した。

拡散信号が現れる時間スケールは用いるスリットの格子間隔に依存する。格子間隔が小さいほど短い距離の拡散で回折格子が消滅するためである。この性質を利用することで拡散信号の時間発展を捉えることが可能になる（図3）。

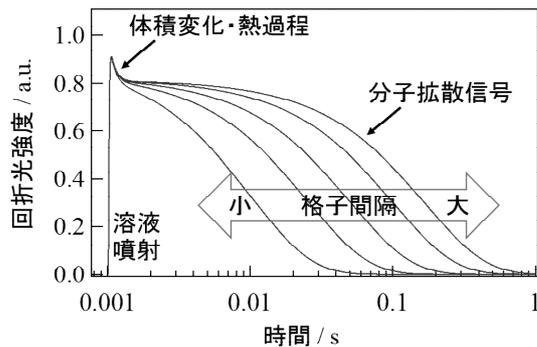


図3: 予想される信号 (格子間隔依存性)

本研究では金属微細加工会社との連携により、スリット幅が 10, 25, 50 マイクロメートルの多孔スリットを開発し、これをサンプル流路に取り付けるアダプターも作製した。（拡散信号の減衰速度は格子間隔の二乗に比例するため、測定タイムレンジは 25 倍におよぶ）。

スリットから噴射される領域に測定光を入射すると、噴射時のみに特定の角度に回折光が観測された。これは噴射により形成され

た濃度勾配による屈折率変調を、回折光として捉えたことを示している。噴射をストップした後に拡散により消滅する過程を解析したが、自由拡散で予想されるよりも 10 倍程度速い減衰速度で屈折率変調が解消することがわかった。これは噴射に伴い乱流が発生することで、濃度（屈折率）変調が急速に崩れてしまったためだと考えられる。噴射速度の調節やスリット幅の変更など試行錯誤したが、いずれも再現性の良いデータは得られず、文献値と一致する拡散係数は得られなかった。

精度の高い測定を達成するには噴射に伴う乱流を抑えることが必要となる。そのために噴射孔面積を大きく取るなど噴射速度の抑制を目指した予備実験を繰り返し行い、また流体シミュレーションによる至適条件の探索も行った。しかし、極めて緩やかな噴射であっても乱流の発生を抑制することは難しいことがわかり、高速混合技術との融合は困難であることがわかった。

4. 研究成果

立ち上げたストップフローシステムを用いて「光センサータンパク質の変性ダイナミクス」および「時計タンパク質の集合反応」を時間分解検出した。

光センサータンパク質 phototropin の酸変性

Phototropin (phot) は、高等植物や藻類の様々な運動反応を制御する青色光センサー蛋白質であり、光受容を担う二つの LOV ドメイン (LOV1、LOV2) と、活性化を示す Ser/Thr kinase ドメイン、さらに LOV2 と kinase を結ぶ linker ドメインから構成される。先行研究により LOV2 ドメインが機能に必須であることが報告され、また LOV2 に光照射すると linker 部分のヘリックス構造が壊れ、これにより kinase ドメインが活性化されることが示唆されている。図4に LOV2-linker の結晶構造を示す。

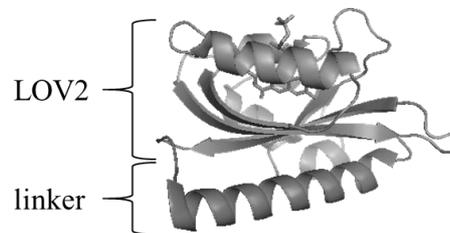


図4 LOV2-linkerの結晶構造

TG法により LOV2-linker 試料の測定を行うと、光励起後に強い立ち上がりで減衰からなる山型の拡散信号が得られる。これは光反応において拡散係数が大きく変化したことを示す信号であり、ヘリックスの崩壊過程によって溶媒との相互作用が変化したことが要

因であることがわかっている。そこで本研究では、ストップフローシステムにより LOV2-linker 溶液の pH を瞬時に低下させ (pH ジャンプ) その後の変性過程を TG 信号の変化として捉えることを試みた。TG 信号強度は正常な光反応を起こした分子数に対応するため、本測定により反応性 (機能) を失う過程を捉えることが可能である。

図 5 (上) に pH ジャンプ後に遅延時間を変えて測定した TG 信号を示す。混合前の信号 (最も強い信号) に比べて、測定のデッドタイム以内で信号強度が大幅に減少することがわかった。その後、なだらかに信号強度が減少し、40 秒後には完全に消失した。図 5 (下) には、信号強度を遅延時間に対してプロットした。この図からも明らかなように変性反応は 2 段階で起こることが示された。pH ジャンプ後 200 ms 以内では発色団近傍の変化は保存されていることが別で行った過渡吸収測定により示されたため、発色団以外の部位で linker の崩壊反応に必要な信号伝達が阻害されていることが示唆された。その要因は定かではないが、LOV2 ドメインと linker をつなぐ領域の salt bridge が pH ジャンプによって壊れ、シグナル伝達経路が遮断されたためだと予想している。

一方、遅い反応は時定数が 11 s と求まった。この過程では発色団が LOV2 ドメインから外れることが吸収スペクトル測定により明らかとなり、また CD 測定により暗状態における二次構造も部分的に壊れることがわかった。つまりタンパク質構造の崩壊とともに光反応性が完全に失われたと考えられる。

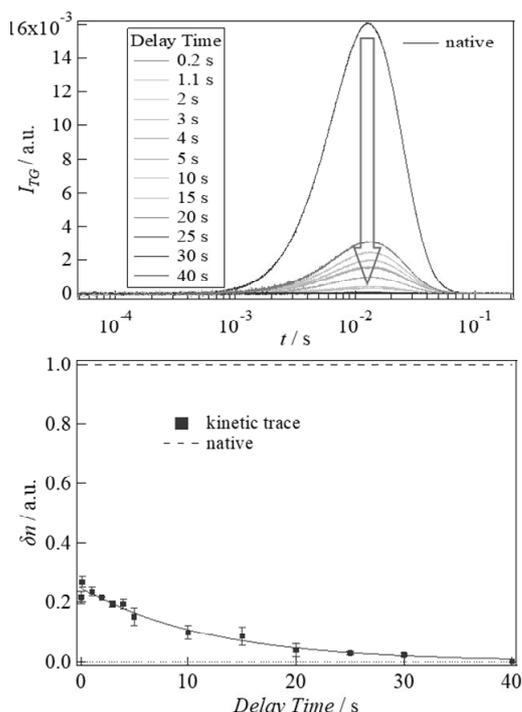


図5 (上) 酸変性に伴うTG信号の変化
(下) 信号強度 vs 遅延時間

変性研究はタンパク質の構造崩壊をモニターすることが一般的である。一方、本研究では光反応性という観点から変性過程を調べた。その結果、構造は保たれており、また発色団近傍の反応も保たれている時間スケールにおいても信号伝達が阻害されることがわかった。これは本研究独自の成果である。

時計タンパク質 KaiC の集合反応

KaiC はシアノバクテリア由来の時計タンパク質であり、興味深いことに KaiA、KaiB というタンパク質と混合し、ATP を加えると *in vitro* の系においても自発的に 24 時間周期を刻む。その過程においてタンパク質間の離合集散や、KaiC のリン酸化状態が変化することが知られており、その分子機構の研究は盛んに行われている。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。この反応は可逆的であり、時計機能を発揮する際に、ヘキサマーの解離・会合を通じて、ヘキサマー間でモノマーユニットの交換を行うことができる。これが系全体において 24 時間周期の位相を同調させる重要な機構であると予想されている。

そこで本研究ではその分子機構を明らかにすべく、KaiC のヘキサマー形成ダイナミクスの検出を目指した。ATP と KaiC を高速混合し、その後の集合反応を拡散係数変化として捉えることが狙いである。しかし、KaiC は光反応性のタンパク質ではないため、TG 信号を取得するために、先述のスピロピランによるラベル化を行った。図 6 にラベル後の TG 信号を示す。モノマー (ATP 無し) とヘキサマー (ATP 有り) は、異なる拡散係数を持つことがわかった ($D_{\text{monomer}} = 8.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, $D_{\text{hexamer}} = 3.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)。この結果は会合状態の違いを拡散係数の差として検出できることを示している。

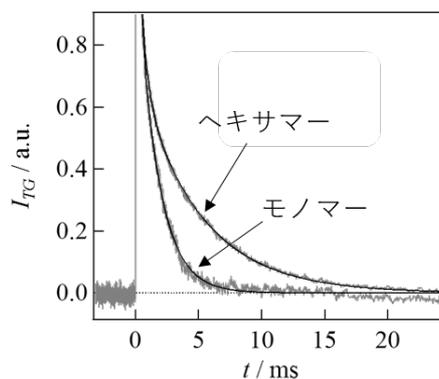


図6 KaiCのTG信号

次に、ヘキサマー形成反応を時間分解で捉えるために、ストップフロー装置を用いてモノマーKaiC と ATP を高速混合し、その後の反応を TG 測定により検出した。その結果、図 7 (上) に示すように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。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図7(下)のような時間変化を示した。拡散係数が時間とともに単調に減少しており、一指数関数でよく再現できた。得られた時定数は7.9秒であり、これがヘキサマー形成の速度であることがわかった。

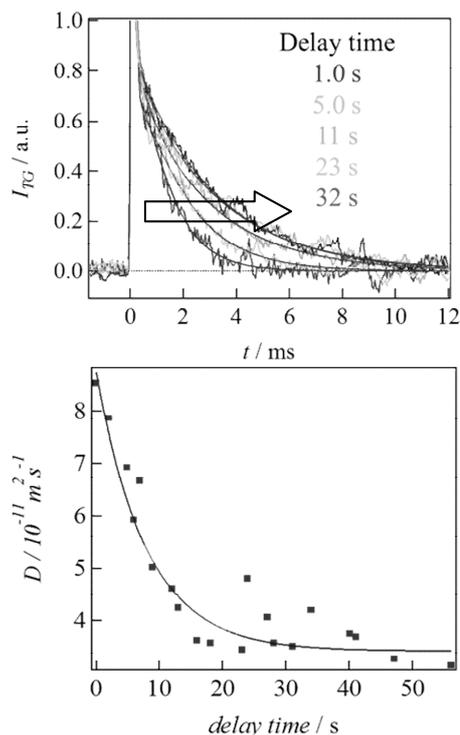


図7(上) KaiCのTG信号の時間発展
(下) 拡散係数 vs 遅延時間

図8にヘキサマー形成過程のスキームを示す。本研究により、時間分解でヘキサマー形成反応を捉えることに成功したが、当初の目的はモノマーにATPが結合したときの構造変化や、ヘキサマーを形成する前段階(ダイマーやトリマーの形成)の検出であった。しかし、KaiCはモノマーがアグリゲーションしやすく、きれいな信号の取得が困難であった。現在はモノマーを安定化する条件下で再実験を行っており、その詳細を明らかにする予定である。

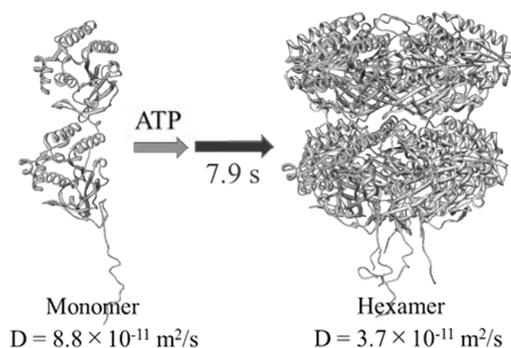


図8 KaiCヘキサマー形成ダイナミクス

本課題で構築したシステムは多様な生体分子反応に応用可能であり、酵素反応や多量体形成反応を対象に測定を進めている。

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 11 件)

- Photoreaction of BlrP1: the role of a nonlinear photo-intensity sensor.
Shibata K, Nakasone Y, Terazima M.
Phys Chem Chem Phys. 2018. 20: 8133-8142.
doi: 10.1039/c7cp08436f.
- Sequential DNA Binding and Dimerization Processes of the Photosensory Protein EL222.
Takakado A, Nakasone Y, Terazima M.
Biochemistry. 2018. 57: 1603-1610.
doi: 10.1021/acs.biochem.7b01206.
- Photoreaction Dynamics of LOV1 and LOV2 of Phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii*.
Nakasone Y, Ohshima M, Okajima K, Tokutomi S, Terazima M.
J Phys Chem B. 2018. 122: 1801-1815.
doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10266.
- Photoinduced dimerization of a photosensory DNA-binding protein EL222 and its LOV domain.
Takakado A, Nakasone Y, Terazima M.
Phys Chem Chem Phys. 2017. 19: 24855-24865.
doi: 10.1039/c7cp03686h.
- Light-Induced Conformational Changes of LOV2-Kinase and the Linker Region in *Arabidopsis* Phototropin2.
Takakado A, Nakasone Y, Okajima K, Tokutomi S, Terazima M.
J Phys Chem B. 2017. 121: 4414-4421.
doi: 10.1021/acs.jpcc.7b01552.
- Anomalous pressure effects on the photoreaction of a light-sensor protein from *Synechocystis*, PixD (Slr1694), and the compressibility change of its intermediates.
Nakajima T, Kuroi K, Nakasone Y, Okajima K, Ikeuchi M, Tokutomi S, Terazima M.
Phys Chem Chem Phys. 2016. 18: 25915-25925.
doi: 10.1039/c6cp05091c.
- Time-Resolved Detection of Light-Induced Dimerization of Monomeric Aureochrome-1 and Change in Affinity for DNA.
Akiyama Y, Nakasone Y, Nakatani Y, Hisatomi O, Terazima M.
J Phys Chem B. 2016 120: 7360-70.
doi: 10.1021/acs.jpcc.6b05760.
- Dynamics of Inter-DNA Chain Interaction of Photoresponsive DNA.
Nakasone Y, Ooi H, Kamiya Y, Asanuma H,

Terazima M.
J Am Chem Soc. 2016. 138: 9001-4.
doi: 10.1021/jacs.6b02525.

9. Photochemical Reactions of the LOV and LOV-Linker Domains of the Blue Light Sensor Protein YtvA.

Choi S, Nakasone Y, Hellingwerf KJ, Terazima M.

Biochemistry. 2016. 55: 3107-15.
doi: 10.1021/acs.biochem.6b00263.

10. Time-resolved fluctuation during the photochemical reaction of a photoreceptor protein: phototropin1LOV2-linker.

Kuroi K, Sato F, Nakasone Y, Zikihara K, Tokutomi S, Terazima M.

Phys Chem Chem Phys. 2016. 18: 6228-38.
doi: 10.1039/c5cp07472j.

11. Reaction dynamics of the UV-B photosensor UVR8.

Miyamori T, Nakasone Y, Hitomi K, Christie JM, Getzoff ED, Terazima M.

Photochem Photobiol Sci. 2015. 14: 995-1004.
doi: 10.1039/c5pp00012b.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 光センサー-phototropin の光反応と多様性

中曽根祐介

日本化学会 第 98 春期年会 2018 年 3 月

2. Time resolved study of protein reaction using transient grating method combined with stopped-flow apparatus

中曽根祐介

新学術領域「動的秩序と機能」第 6 回国際シンポジウム 2018 年 1 月

3. 拡散・揺らぎの時間分解検出に基づくタンパク質機能の分子論的理解

中曽根祐介

第 40 回溶液化学シンポジウム 2017 年 10 月

4. 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

中曽根祐介

第 11 回分子科学討論会 2017 年 9 月

5. 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

中曽根祐介

日本化学会 第 97 春期年会 2017 年 3 月

6. DIVERSITY OF PHOTOREACTIONS OF BLUE LIGHT SENSOR PHOTOTROPINS AMONG DIFFERENT ORGANISMS

中曽根祐介

新学術領域「動的秩序と機能」第 5 回国際シンポジウム 2017 年 1 月

7. Diversity of photoreaction of phototropin among different organisms

中曽根祐介

第 54 回生物物理学会年会 2016 年 11 月

8. Time-resolved detection of conformational changes of full-length phototropin

中曽根祐介

第 10 回分子科学討論会 2016 年 9 月

9. Transient dimerization and conformational dynamics of full-length phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii*

中曽根祐介

Pacificchem 2015 2015 年 12 月

10. Photoreaction dynamics of full-length phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* and the diversity of signaling mechanism

中曽根祐介

The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology 2015 年 11 月

11. Diversity of phototropin studied from the viewpoint of photoreaction dynamics

中曽根祐介

第 53 回生物物理学会年会 2015 年 9 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/hikari/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中曽根 祐介 (NAKASONE YUSUKE)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00613019