

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288005

研究課題名(和文) 時間分解分子間相互作用検出システムの開発とタンパク質反応機構の解明

研究課題名(英文) Development of systems for time-resolved intermolecular interaction detection during protein reactions and application to 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) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：過渡回折格子法をストップフローシステムと組み合わせて反応中間体の拡散係数を測定するため、液体の乱流を軽減する工夫を凝らした装置を組み立てた。また、高速でサンプルを流すための装置構築も行い、数100ミリ秒で乱流を押さえることに成功した。次に、タンパク質に応用するため、使用する溶液量を格段に減らすサンプルセルの工夫を行った。この結果、数マイクロリットルの溶液で高速混合し、信号を取れるようになった。この装置を用いて光センサータンパク質フォトトロピンの酸変性過程の時間分解検出や、ATPとの混合によって誘起される時計タンパク質KaiCの会合反応を調べることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In order to measure the translational diffusion coefficient change by the transient grating method combined with a stopped flow system, we constructed a new stopped flow system for minimizing turbulence after mixing two solutions. This system can suppress the turbulence within 100 ms after the mixing. Furthermore, we improved the system to decrease a volume of required sample solution, and succeeded in mixing only a few micro liter solution, which is a big advantage for application to protein samples. By using this system, we measured a diffusion coefficient change in time-domain after acid denaturation of a photosensor protein of phototropin sample. Moreover, association reaction of a protein of KaiC which has a function to control the circadian rhythm was detected in time-domain.

研究分野：生物物理化学

キーワード：タンパク質 反応 時間分解 拡散係数

1. 研究開始当初の背景

分子間相互作用は、分子の世界に多様性を持たせ、化学反応には不可欠な因子である。そのため、反応との関わりやその原因について、分子科学においても中心課題であり続けている。特に生体分子が機能を発揮するためには分子間相互作用がすべてを決めると言っても過言でないほどであり、例えば生体内での信号伝達や酵素作用にも深くかかわっている。また、それを引き起こす生体分子の構造変化過程ダイナミクスは、分子間相互作用の原因や速度を決める非常に重要な過程であり、その実験的検出の重要性は論を待たない。しかし、タンパク質の高次構造変化を時間分解で検出したり、分子間相互作用ダイナミクスを明らかにできる手法はこれまでほとんど存在しなかった。

一方で、申請者のグループは、過渡回折格子(TG)法を用いて、熱力学量や拡散係数を化学反応ダイナミクスと共に変化する量としてとらえるという独自の画期的な手法を開発してきた。この手法を用いることで通常の分光法ではその存在さえ確認できない中間体を数々発見してきたし、また分子間相互作用変化を敏感に検出することに成功した。それだけでなく熱力学量を通して短寿命中間体の性質を明らかにすることができ、生体分子研究にはなくてはならない手法であることを示してきた。しかも、拡散係数の時間発展を測定することでタンパク質間相互作用を時間分解検出できることも示し、バイオセンサーとしての高いポテンシャルを報告している。

しかし、この手法でも完全ではなく、多くの分野で用いられるようなバイオセンサーとして使う場合には、以下のような、いくつかの解決しなくてはならない基礎学術的な課題が残されていた。

2. 研究の目的

これまで、TG法による生体反応研究のための測定原理や解析手法を開発してきたが、2つの大きな制限があった。一つは、TG法では、励起光で濃度分布を作り出すために、光で反応が開始できる系でないと分子間相互作用などを検出するのが困難という点である。生体分子において光センサーは重要なセンサータンパク質であり、ほとんどすべての生物が各種の光センサータンパク質を持っている。また多くの時間分解分光研究によってそのダイナミクスを含めた詳細な反応機構を研究するのに適しているため、対象として取り上げられることが多く、光センサー研究には重要な意義があった。しかし、生体タンパク質全体で見た時には、光センサータンパク質はまだ一部であり、かなり多くのタンパク質反応は光とは関係なく起こる。こうした光とは関係ないタンパク質反応までこの手法が適用できれば素晴らしい進展になるであろう。

この制限をなくするため、ここではストップドフローシステムとTG法を組み合わせた新しいシステムを作り上げる。ストップフローとは、試料溶液を高速に混合し、瞬時にフローを停止して、その後の試料溶液の吸収・蛍光などの変化を時間分解測定する手法である。タンパク質研究においては酵素反応やフォールディング反応など、様々な反応の反応速度測定、短寿命中間体の検出に利用され、これにより反応活性の評価、反応機構の解析、反応阻害剤・促進剤の評価が行われている。この手法とTG測定を組み合わせることで、従来のTG法をより一般性の高いものに発展させ、一般的なタンパク質反応の構造変化やタンパク質間相互作用の研究を可能とする。

こうした手法を実際に機能する多くのタンパク質反応に適用する事で、機能と分子間相互作用との関わり、更にはその一般性を明らかにする。

3. 研究の方法

過渡回折格子(TG)法の特徴は、多く用いられている表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーと同様に、反応に伴う屈折率変化を検出するのであるが、それを溶液中で高感度に時間分解で行うところにある。TG法の測定原理は、2本の光をある角度で交差させ、干渉を利用することで光強度の空間的な変調を作り、励起によって空間的に異なった分子濃度を作り出すところにある。この濃度分布はそのまま屈折率分布になり、回折格子の役目をするため、プローブ光を別の方向に回折することになる。これがTG信号である。よって屈折率変化をもたらすような相互作用や会合ならば、SPRバイオセンサーと同様に検出できる。しかしそれだけではなく、SPRバイオセンサーにはない多くの特徴を持つ。それは、拡散係数の変化を時間分解でモニターすることができて、タンパク質間相互作用ダイナミクスを高感度に検出することができることである。拡散係数とは、溶液中で分子がどれぐらいの速さで並進運動をしているかを示す値であり、タンパク質の構造や大きさによって変化する。そのため、他の手法では検出が困難な時間分解構造変化や会合変化を検出できることになる。

まずストップドフロー法と組み合わせたシステム開発を試みる。反応中間体の拡散係数を測定する際に最も問題となるであろう液体の乱流を回避、あるいは軽減する工夫を凝らす。そのために、溶液を混合した後なるべく早い時間で止めるためのセルや流路を設計・製作する。また、タンパク質反応への応用を考えるうえで非常に重要となるフローする溶液量の減少を目指す。このため、サンプルセルの容量をなるべく小さくする装置作成を行う。さらに、このシステムを適用する対象を選択するためにも、通常のセルを用いて、多くのタンパク質で反応機構とダイ

ナミクスを明らかにする。

4. 研究成果

ストップフローシステムを、我々が開発してきた過渡回折格子測定装置の中に組み込む試みをした。標準溶液を流すことで、光励起で生じる熱の信号が再現性良く取れる方法を確立し、光異性化を起こす分子を流して、拡散係数を正確に測定できるかどうかを試みた。当初の予想通り、溶液の揺乱のために溶液を止めてから 100ms 以内では正確な拡散係数が測定できないことが分かったが、セルの配置を工夫することで、ある程度その乱流効果を押さえられることがわかった。

また、TG 法をストップフローシステムと組み合わせる場合に、通常のストップフローシステムでは、大量のタンパク質溶液が必要となり、タンパク質反応への応用が困難であることがわかった。そのため、使用する溶液量を格段に減らすためのサンプルセルの工夫を行った。マイクロ流路を用いた結果、数マイクロリットルの溶液で高速混合し、TG 信号を取れることに成功した。また、高速でサンプルを流すためのフローシステムの構築も行い、数 100 ミリ秒で乱流を押さえることに成功した。

この装置を用いて光センサータンパク質フォトトロピンの酸変性過程の時間分解検出を行った。測定の結果、酸性溶液と混合して変性する過程の拡散係数変化を追跡することに成功した。この時間変化より、最初の 100 ミリ秒以内に大きな変性過程があり、それから数秒の時間で徐々に変性していく 2 段階の過程を検出することがわかった。この過程で反応分子と生成分子の拡散係数に変化はなかったため、2 状態的に変性すること、酸変性によって反応効率が落ちていることなどがわかった。また、分子間相互作用を検出するために、ATP との混合によって誘起される時計タンパク質 KaiC の会合反応を調べた。その結果、会合が 7 秒程度で進行していることを観測することに成功した。光トリガーでない会合反応を TG 法でとらえたのはこれが初めてである。

こうしたシステムを確立していく一方で、機能にとって重要なタンパク質反応機構を明らかにした。従来の光励起の方法を用いた分子間相互作用検出の応用として、PixD と呼ばれる青色光センサータンパク質の会合・解離反応ダイナミクスの追跡や、オーレオクロムと DNA との相互作用変化、また YtvA と呼ばれる多くのタンパク質と複合体を作るセンサータンパク質の分子間相互作用検出を時間分解で行った。また、クラウディング効果の解明を行い、例えば、植物の光センサーである、フォトトロピンや PixD についてその反応へのクラウディング効果を明らかとした。これは細胞内での働きの解明に迫るものである。

一方で、反応に伴って分子間相互作用の変

化が起こる原因を検出するために、PixD やフォトトロピンなどの光センサーの分子間相互作用の圧力依存性を調べた。圧力によってその反応が劇的に変化することを見出し、その原因を探った。時間分解で熱力学量を検出することによって、反応途中での揺らぎが反応性をコントロールしていることを証明することに成功した。

これらの技術やタンパク質反応に関する知見は、これから多くの生体分子反応機構解明に役立つことと期待される。

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 22 件)

1. Time-Resolved Fluctuation during the Photochemical Reaction of a Photoreceptor Protein: Phototropin1LOV2-Linker, K.Kuroi, F. Sato, Y. Nakasone, K. Zikihara, S. Tokutomi, M. Terazima, Phys.Chem.Chem.Phys., 18,6228-6238 (2016). doi: 10.1039/c5cp07472j. 査読有
2. Macromolecular crowding effect for photoreactions of LOV2 domains of Arabidopsis thaliana phototropin 1, T. Yoshitake, T. Toyooka, Y. Nakasone, K. Zikihara, S. Tokutomi, M. Terazima, J.Mol.Liq., 217, 43-50(2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2015.08.030>. 査読有
3. Photochemical reactions of the LOV and the LOV-linker domains of the blue light sensor protein YtvA, S. Choi,, Y. Nakasone, K. J Hellingwerf, M. Terazima, Biochemistry, 55, 3107-3115(2016).DOI:10.1021/acs.biochem.6b00263. 査読有
4. Anomalous pressure effects on the photoreaction of a light-sensor protein from Synechocystis, PixD (Slr1694), and the compressibility change of its intermediates, T. Nakajima, K.Kuroi, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, Phys.Chem.Chem.Phys.,18, 25915-25925(2016). DOI: 10.1039/C6CP05091C. 査読有
5. Characterization of thylakoid membrane in filamentous cyanobacteria and green alga with dual-detector fluorescence lifetime imaging microscopy with a systematic change of incident laser power, S. Nozue1, A. Mukuno, Y. Tsuda, T. Shiina, M. Terazima, S. Kumazaki, Biochim.Biophys.Acta.,1857,46-59(2016). doi: 10.1016/j. 査読有
6. Dynamics of Inter-DNA Chain Interaction of Photoresponsive DNA, Y. Nakasone, H. Ooi, Y. Kamiya, H. Asanuma, M. Terazima, J.Am.Chem.Soc.(Communication), 138, 9001-9004(2016). DOI: 10.1021/jacs.6b02525. 査読有
7. Time-resolved Detection of Light-induced

Dimerization of Monomeric Aureochrome-1 and Change in Affinity for DNA, Y. Akiyama, Y. Nakasone, Y. Nakatani, O. Hisatomi, M. Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 120, 7360-7370(2016). DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b05760. 査読有

8. Pressure-sensitive reaction yield of the TePixD blue-light sensor protein, K. Kuroi, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, T. Kamiyama, M. Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 119, 2897-2907(2015). Doi: 10.1021/jp511946u. 査読有

9. Reaction dynamics of the UV-B photosensor UVR8, T. Miyamori, Y. Nakasone, K. Hitomi, J.M. Christie, E. D. Getzoff, M. Terazima, *Photochem.Photobiol.Sci.*,14, 995 - 1004(2015). . 査読有

10. Transient conformational fluctuation of TePixD during a reaction, K.Kuroi, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 111, 14764- 14769 (2014).doi:10.1073/pnas.1413222111. 査読有

11. Photo-Induced Oligomerization of Arabidopsis thaliana Phototropin 2 LOV1, Y.Nakasone, Y. Kawaguchi, S.-G. Kong, M. Wada, M. Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 118, 14314-14325(2014). DOI: 10.1021/jp509448b. 査読有

12. High hydrostatic pressure induces CW to CW reversals of the Escherichia coli flagellar motor, M.Nishiyama, Y.Sowa, Y.Kimura, M. Homma, A. Ishijima, M. Terazima, *J.Bacteriol.*, 195,1809-1814(2013). doi:10.1128/JB.02139-12. 査読有

13. Anomalous diffusion of TePixD and identification of the photoreaction product, K.Kuroi, K.Tanaka, K.Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, *Photochem. Photobiol.Sci.*,12, 1180-1186(2013). DOI: 10.1039/c3pp25434h. 査読有

14. Photochemistry of Arabidopsis phototropin 1 LOV1: transient tetramerization , Y. Nakasone, K. Zikihara, S. Tokutomi, M. Terazima, *Photochem.Photobiol.Sci.*,12, 1171-1179(2013). DOI: 10.1039/c3pp50047k. 査読有

15. Anomalous ground-state proton transfer of 4'-N,N-diethylamino-3-hydroxyflavone in ionic liquids of imidazolium-based cations with tetrafluoroborate, K. Suda, M. Terazima, H. Sato, Y. Kimura, *Chem. Comm.*,49, 3976-3978 (2013). 10.1039/c3cc40943k. 査読有

16. Excitation Wavelength Dependence of Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction of 4'-N,N-diethylamino -3-hydroxyflavone in Room Temperature Ionic Liquids Studied by Optical Kerr Gate Fluorescence Measurement, K. Suda, M. Terazima, H. Sato, Y. Kimura, *J.Phys.Chem.B*, 117, 12567-12582(2013). 10.1021/jp405537c. 査読有

17. Dynamics of the Amino-Terminal and Carboxyl-Terminal Helices of Arabidopsis

Phototropin 1 LOV2 Studied by the Transient Grating, K.Takeda, Y.Nakasone, K.Zikihara, S.Tokutomi, M. Terazima, *J.Phys.Chem.B*, 117,15606-15613(2013). 10.1021/jp406109j. 査読有

〔学会発表〕(計152件)

1. Protein photoreaction for sensing light intensity, K. Kuroi, Y. Nakasone, K. Okajima, M.Ikeuchi, S.Tokutomi, M. Terazima, 26th IUPAC Symposium on Photochemistry 2016, Osaka, Japan, April 3-8, 2016.

2. Translational diffusion of transient intermediate species during protein reactions:Phototropin, M. Terazima, K. Takeda, Y. Nakasone, K. Zikihara, S. Tokutomi, 3rd International Conference on Fluid Flow, Heat and Mass Transfer, Ottawa, Canada, May 2 - 3, 2016.

3. A biosensor to detect inter-protein interaction and domain-domain interaction, M. Terazima, International Conference on Small Science, Prague, Czech Republic, June 25 - 29, 2016.

4. Advanced light sensing natural proteins that can detect light intensity, M. Terazima, Asia Pacific Society for Materials Research, Sun Moon Lake, Taiwan, August 11-14 2016.

5. Time-resolved thermodynamics for short lived intermediate species during a photosensor protein, M. Terazima, 11th International Workshop on Subsecond Thermophysics, Kraków, Poland, June 21-24, 2016.

6. 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, 中曾根 祐介, 寺嶋 正秀, 分子科学討論会, 神戸, 9月13 - 15日, 2016

7. 赤色光センサータンパク質 Cph1 の pH 依存的光反応, 武田公利, 寺嶋正秀, 分子科学討論会, 神戸, 9月13 - 15日, 2016.

8. Transient fluctuations during protein reactions detected by time-resolved thermodynamics, M. Terazima, 9th Korea-Japan Seminars on Biomolecular Science, Gyeongju, Korea, November 14 -16, 2016.

9. Time-resolved detection of the transient grating signal using stopped flow system, S.Takaramoto, Y.Nakasone, M. Terazima, 第54回日本生物物理学会年会、筑波、2016年11月25日 27日.

10. Protein diffusion of reaction intermediates under crowded condition, M. Terazima, International Conference on Fluid Flow, Heat and Mass Transfer, Ottawa, April 30 - May 1, 2015

11. Time-resolved study on driving force of protein reactions, M. Terazima, 2015 Collaborative Conference on 3D and Materials Research, Busan, Korea, June 15 - 19, 2015.

12. Compressibility and reactivity of a protein reaction, M. Terazima, 19th Symposium on Thermophysical Properties, Boulder, Colorado U.S.A., June 21 - 26, 2015

13. 生体分子の見えない動きを時間分解で観る, 寺嶋正秀, 生物物理若手の会夏の学校、大津、2015年8月21-24日

14. Time-resolved detection of light induced heat during protein reactions, M. Terazima, 18th International Conference on Photoacoustic and Photothermal Phenomena, Novi Sad, Serbia, September 6-10, 2015.

15. タンパク質反応における揺らぎと動的分子間相互作用, 寺嶋正秀, 分子科学討論会、東京工業大学大, 9月16日 - 19日

16. 光応答性 DNA 結合タンパク質 EL222 の反応ダイナミクス研究, 高門 輝, 中曽根 祐介, 寺嶋 正秀, 分子科学討論会、東京工業大学大, 9月16日 - 19日

17. 光制御転写因子 Aureochrome1 の二量体化反応および DNA との相互作用ダイナミクス, 秋山 祐樹, 中曽根 祐介, 久富 修, 中谷陽一, 寺嶋 正秀, 分子科学討論会、東京工業大学大, 9月16日 - 19日

18. 光応答性 DNA の二重鎖形成および解離反応の時間分解検出, 中曽根祐介、大威英晃、神谷由紀子、浅沼浩之、寺嶋正秀, 分子科学討論会、東京工業大学大, 9月16日 - 19日

19. Photo-induced reaction dynamics of blue light sensory protein BlrP1, K. Shibata, Y. Nakasone, M. Terazima, 第53回日本生物物理学会年会、金沢、2015年9月13日□15日

20. Transient conformational fluctuation of TePixD during a reaction, K. Kuroi, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M. Terazima, 第53回日本生物物理学会年会、金沢、2015年9月13日□15日

21. タンパク質の反応を誘起する揺らぎ：フォトリポピン, 黒井 邦巧, 中曽根祐介, 徳富哲, 寺嶋 正秀, 第38回溶液化学シンポジウム、高知市カルポート、2015年10月21日-23日

22. A new detection method for characterizing intermediate states of protein reactions, M. Terazima, International Conference on Small Science, Phuket, Thailand, November 4 - 7, 2015.

23. Conformation changes and water-protein interaction change for function of proteins, M. Terazima, PACIFICHEM 2015, Hawaii, Dec., 15-20, 2015.

24. 青色センサー蛋白 SyPixD の高圧下における反応ダイナミクス, 中島 翼・黒井 邦巧・岡島 公司・池内 昌彦・徳富 哲・寺嶋 正秀, 第94日本化学会春季年会、名古屋、2014年3月27日~30日

25. タンパク質の拡散に対する込み合い効果, 寺嶋正秀, 日本物理学会 第69回年次大会、平塚、2014年3月27日~30日

26. 青色光センサータンパク質 PapB のシグナル伝達反応機構, 菊川 耕太郎、中曽根 祐介、増田 真二、寺嶋 正秀, 分子科学討論会、広島大学 2014年9月21日~24日

27. Importance of fluctuation for reactions of

light sensors, M. Terazima, Gordon Research Conference on: Photosensory Receptors & Signal Transduction, 4/6-11, 2014.

28. time resolved measurements of thermodynamic properties during chemical reactions of bio-molecules, M. Terazima, "Thermophysical and mechanical properties of advanced materials", 6/12-15, 2014, Cesme-Izmir, Turkey

29. Sensing of Protein Reactions using pulsed laser based transient grating, M. Terazima, Frontiers in Optics 2014/Laser Science XXX (FiO/LS) meeting, Tucson, USA, 2014/10/19-23

30. Photosensing reaction dynamics of flavin proteins: Phototropin, M. Terazima, 16th International Conference on Retinal protein, Nagahama Royal Hotel, Japan, 2014/10/5 - 10.

31. Conformation change of a flavoprotein for signal transfer: phototropins, M. Terazima, 18th International Flavin Symposium, 7/27-8/1, 2014, Thailand

32. 揺らぎと分子間相互作用の時間分解検出 寺嶋 正秀 「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」, 木津、2013年4月21日

33. 時間分解拡散係数法で見るタンパク質反応ダイナミクス：フォトリポピン, 寺嶋正秀, 溶液化学シンポジウム、北海道、2013年10月9日—12日

34. Photochemistry of full-length phototropin from green algae, Y. Nakasone, K. Okajima, K. Hitomi, Y. Aihara, A. Nagatani, J. Christie, S. Tokutomi, M. Terazima, 生物物理年会、京都、2013年10月28 - 30日

35. Spectrally Silent Dynamics of Photo-induced Protein-Protein Interaction, M. Terazima, Korean-Japan Bilateral Symposium on Frontier Photoscience, Nov.24-27, 2013.

〔図書〕(計 4件)

1. Time-Resolved Detection of Protein Fluctuations During Reactions, M. Terazima, Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions, 1-28, 2016, Springer. 分担執筆

2. 過渡回折格子法, 寺嶋正秀 (分担執筆), 光と生命の事典、356-357, 2016, 朝倉書店 ISBN978-4-254-17161-7

3. 蛍光蛋白質, 寺嶋正秀 (分担執筆), 「光化学の事典」, 光化学協会光化学の事典編集委員会 編、朝倉書店, 2014 ISBN978-4-254-14096-5 C3543

4. 現代物理化学, 寺嶋正秀、馬場正昭、松本吉泰, 2015年, 化学同人 ISBN978 -4-7598 -1809-3

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況（計 0 件）

〔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

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

(3)連携研究者

(4)研究協力者