

光相分離性タンパク質の時間分解構造解析 Time-resolved Structural Analysis of Phase Separation of Light Sensor Protein

中曽根祐介¹, 床次俊朗¹, 小田隆²

¹ 京都大学大学院理学研究科

〒606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

² 立教大学, 〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1

Yusuke NAKASONE^{1*}, Shunrou TOKONAMI and Takashi ODA²

¹ Graduate School of Science, Kyoto University

Kitashirakawa oiwakecho, Sakyo, Kyoto, 606-8502, Japan

² University of Rikkyo, 3-34-1 Nishiikebukuro, Toyoshimaku Tokyo 171-8501, Japan

1 はじめに

生体分子の流動的で可逆的な自己集合である液-液相分離（以下「相分離」）は、膜を持たないオルガネラとして細胞内の区画化や効率的な反応場の構築を担う。環境変化に応じて動的に相分離の形成・解消が起こるため、生命の柔軟性・恒常性を支える重要な要素として近年注目を集めている。また相分離の異常はアルツハイマー病など重篤な神経変性疾患を引き起こすことが知られており、医学・薬学の分野からも相分離機構の理解が求められている。

相分離性タンパク質は一般に天然変性領域を多く含むため、取りうる構造の自由度が高い特徴がある。これを利用して、多彩で動的な相互作用を形成することが、相分離の流動性・可逆性の分子基盤と考えられる。しかし、これまでの相分離研究は、光学顕微鏡による液滴観察や、ゲルや繊維など固体化した状態の構造解析が主であり、相分離機構の理解に必須な溶液中での動的な構造変化や分子間の離合集散過程を時間分解検出した例はない。これを実現できれば、相分離の実態解明が進み、安定構造や安定な分子間相互作用の解析に基づく従来の生命科学の理解を一新する意義深い研究となる。

こうした背景の中、申請者はシアノバクテリア由来の青色光センサーPixDが光照射下で相分離し、光照射を切ると直ちに相分離が解消することを発見した。単離した天然タンパク質の光相分離は世界初の発見であり、新奇性の高い分子として、その機能や分子機構に興味を持たれる。PixDの結晶構造は報告されており（10量体構造）、相分離性タンパク質に特有と考えられてきた天然変性領域を持たない点が興味深い（図1）¹。申請者は光照射下で高次構造が壊れ、これが相分離を駆動すると考えているが、定常測定では光照射後の液滴状態の観測にとどまり、過渡的な構造変化に関する情報が得られない。また分子の会合様式についても集合状態の構造が不明であるため、知見が得られていない。そこで本研究では、分子の構造変化や過渡的な集合体形成過程を検

出するために、高い時間分解能を有する光 SAXS 法の開発を行った。そして、PixDの相分離反応に適用し、相分離機構の分子論的・速度論的理解を推進することを目的とした。これまでに測定系の構築を進め、PixDの集合反応や、様々な光センサータンパク質の光依存的な構造変化や分子間の会合・解離反応を捉えることに成功したため、ここに報告する。

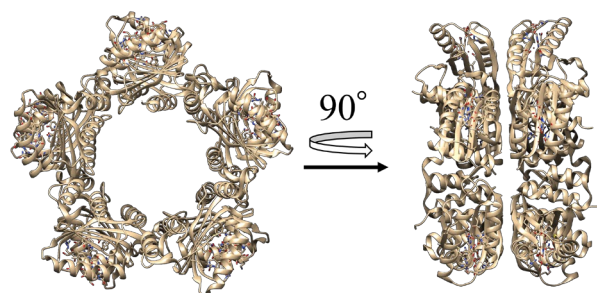


図1 : PixDの結晶構造 (PDB ID: 1X0P)

2 実験

シリンジポンプを用いてタンパク質試料を Topas (COC) 製の細い流路に送液し、X線照射位置に到達する直前でレーザー光（連続発振光）を照射する。光励起されてから SAXS 測定にかかるまでの時間が反応時間となるため、レーザー光照射位置や送液速度を変えることで、光反応を時間分解で捉えることが可能となる（図2）。送液しながら測定を行うため X線損傷の影響を軽減できる点が優れており、暗回復を待つことで同一サンプルを繰り返し測定することが可能である（もし X線損傷が見られた場合は、フレッシュな試料に交換する）。送液による圧力で流路が膨張し、これが SAXS プロファイルに影響することがわかったため、バッファー試料も全ての流速下で測定し、精度の高い解析を実現した。

現在の最大流量は 24 ml/min であり、使用している流路の系が幅 1.00 mm、奥行き 0.20 mmであることを考慮すると、流路を流れる際の最大流速は 2.0 m/s となる。この場合、例えばレーザー光照射位置と X線照射位置の距離を 1 mm に設定すると、反応

時間は 500 μs となり、サブミリ秒程度の時間分解能を達成したことになる。ただし、流速を高めるとサンプルがレーザー照射位置を瞬時に通過してしまうため、光状態の蓄積割合が低下する恐れがある。そこで高出力のレーザー（最大 1200 mW）を光学レンズでサンプルに集光し、効率的に光反応を誘起することを実現した（実際の光状態の蓄積割合は、その都度 SAXS プロファイルのレーザー光強度依存性を調べることが算出し、各測定でほぼ 100% の分子が光状態に変換されることを確認した）。また実際の測定では、観測したい反応の時間スケールに合わせて、流速や照射位置間距離の調節を行った。さらに再現性・信頼性の高い測定を実現するために、フローセルを固定するための治具を作製し、これを微動ステージに設置した。

流路のイメージ図

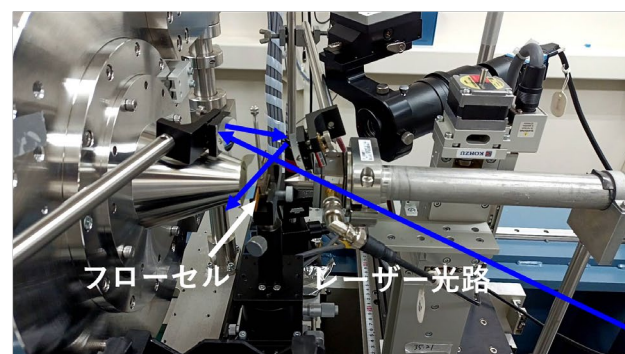
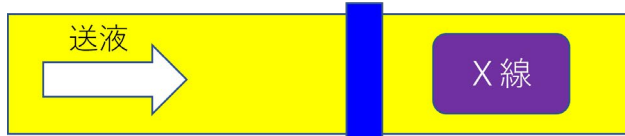


図 2 : (上) 流路のイメージ図、(下) 測定系の写真 (全体写真と拡大写真)

3 結果および考察

PixD の光相分離過程を調べる前に、テスト測定として様々な光センサータンパク質の反応解析を行った（植物由来の光センサー-Phototropin、シアノバクテリア由来の光センサー-PAC、光合成細菌由来の光センサー-PYP など）。ここでは代表例として、PixD

のホモログタンパク質の測定例を示す。異なる生物種由来の PixD は、光で相分離する代わりに、光で 10 量体から 2 量体へと解離するものが存在する。この解離反応の時間分解解析を行った結果を図 3 に示す。光照射により小角領域の散乱強度が減少し、反応時間の経過とともに一定値に達した。これは解離反応によって平均分子量が低下したことを捉えたものである。また散乱パターンも大きく変化しており、リング状の 10 量体構造が壊れたことを確認できた。各時間における平均分子量を、反応時間に対してプロットした結果、解離反応の時定数を 69 ms と決定した（図 3）。この解離物は暗条件下に置くと自発的に元の 10 量体構造へと回復する（会合反応）。送液速度を変えることで、暗回復する過程も捉えており、その時定数を 11 s と決定した。このように可逆的な解離・会合反応を個別に捉えることに成功している。以上、本研究で立ち上げた測定系により、生命機能の発現に必要な分子間反応の時間分解検出が可能であることを示すことができた。

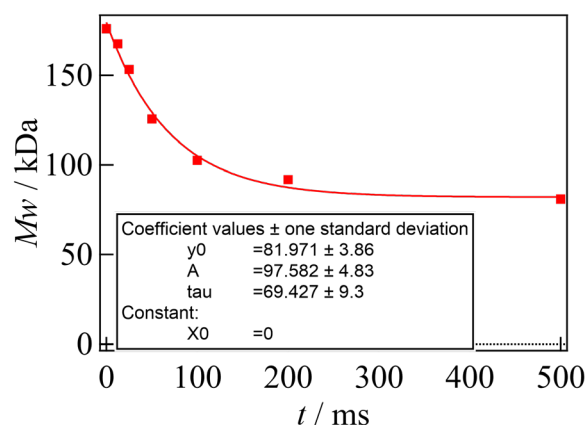
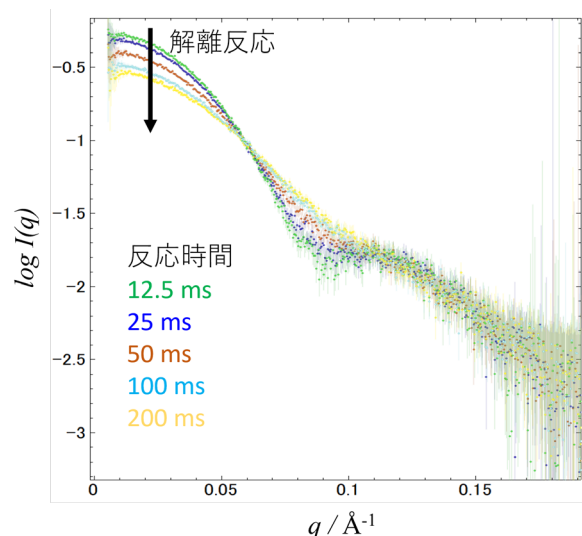


図 3 : (上) 光解離反応に伴う SAXS プロファイルの時間変化、(下) 平均分子量と反応時間のプロット (赤の実線は単一指数関数によるフィッティングカーブ)

続いて光で相分離する PixD の光集合反応を捉えたデータ例を図 4 (上) に示す。光照射による分子間の集合反応に伴い、小角側の散乱強度が増加し、少し広角領域では減少する様子が観測された (この測定では送液速度を一定に保ち、照射間距離を変えることで反応時間を掃引した)。続いて光照射後の反応時間をさらに伸ばしていくと、暗回復に伴い元の 10 量体構造に戻る過程が観測された (図 4 (下) : この解析では照射間距離を一定に保ち、送液速度を切り替えることで反応時間を調節した)。これらの解析により、分子間の集合反応は 1 ~ 5 s 程度の時間スケールで起こり、その後 5 ~ 20 s の時間にかけて元の状態に戻ることを明らかにした。

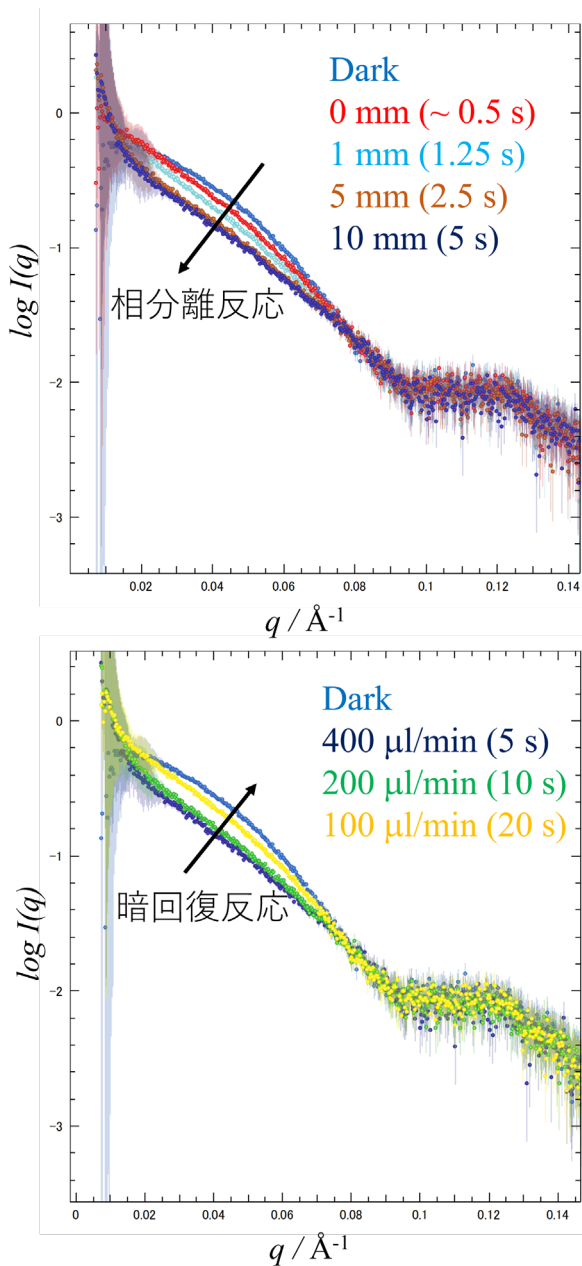


図 4 : (上) 光相分離過程 (分子集合反応) における SAXS プロファイルの時間変化、(下) 暗回復過

程 (解離反応) における SAXS プロファイルの時間変化

現在は、より広角側の散乱パターンの取得を進めており、分子集合反応を引き起こす構造変化の解析や、相分離初期過程に現れる小さい集合体の構造解析を進めている。データ解析においては EOM 解析や基準振動解析を取り入れることで、溶液中における PixD の詳細構造を、その多様性ととも明らかにし、相分離機構の分子論的・速度論的理解を達成する予定である。

4 まとめ

相分離性タンパク質は取りうる構造や会合様式が多彩で、これが時間とともに絶えず変化する。本課題により立ち上げた時間分解 SAXS 法は、溶液中における過渡的な状態 (非平衡状態) の構造解析を可能とし、また速度論的な解析により相分離の律速段階を同定することが可能になると期待される。本手法は、相分離性タンパク質に限らず、光反応性のタンパク質全般に適用可能であるため、今後も様々な系へ応用し、分子内・分子間反応の時間分解解析を進めたい考えである。

謝辞

本成果は PF スタッフのご協力のもと得ることができました。ビームラインのセットアップ以外にも、些細な質問にも丁寧にご対応くださり、ありがとうございます。この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

[1] A. Kita et al. *J Mol Biol*, (2005) 349, 1.

* nakasone@kuchem.kyoto-u.ac.jp