

# 研究題目 分光計測と質量分析の融合による光機能性タンパク質の反応構造解析

## 研究組織

研究代表者：中曽根祐介（京都大学理学研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

## 【1】研究の概要

### [1-1] 本研究の目的・概要

多くの生命は外界を認識し応答するために光情報のセンシング機構を持つ。本課題の研究対象である 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タンパク質であり、光受容を担う二つの LOV ドメイン (LOV1, LOV2) と光依存的に活性化される kinase ドメインからなる (図 1a)。その信号伝達機構は多くの興味を集めてきたが、全長タンパク質の回収が困難であったため、kinase ドメインの活性化機構を直接捉えた研究例は無い。しかし、最近になって中曽根は、緑藻 *Ostreococcus tauri* 由来の全長タンパク質 (*Ot-phot*) の精製に成功した。そこで本研究では、独自の分光法 (過渡回折格子法) による時間分解での反応解析と、Cross-link 質量分析による空間分解での反応解析を融合した新たな解析技術を開発し、光機能性タンパク質 phototropin の活性化機構を解明することを目的とする。

### [1-2] 研究の方法・経過

【方法】過渡回折格子 (TG) 法は、パルスレーザーを用いた分光解析技術の一つであり、並進拡散係数の変化を介してタンパク質の高次構造変化や会合・解離反応を時間分解検出できる。これまでに *Ot-phot* の光反応解析を進め、光励起により発色団近傍の構造変化が  $1 \mu\text{s}$  の時定数で起こり、続いてヘリックス構造がほどける反応が  $14 \text{ms}$  の時定数で起こることを明らかにした。しかし、拡散係数はマクロな物理量であるため、それ単独では反応機構の詳細に迫れない。そこで本研究では、Cross-link 質量分析法 (XL-MS) との融合解析を実施する (図 1b)。

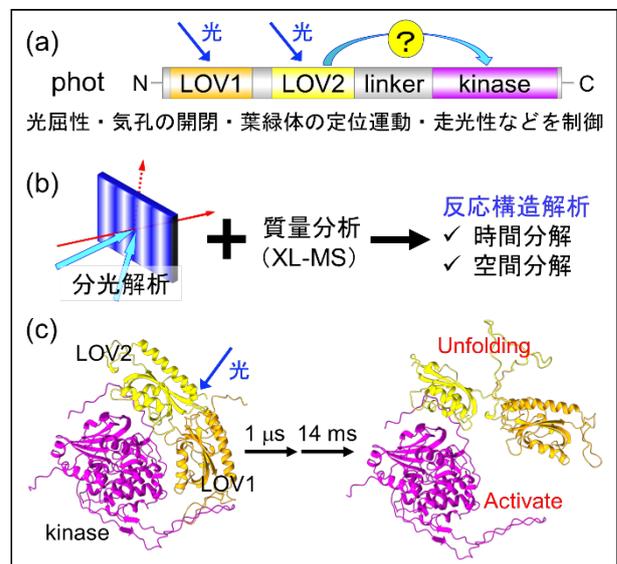


図1 (a) photの一次構造と機能、(b) 本研究で開発する技術の概念図、(c) photの反応モデルの例

XL-MS では Cross-link 剤である DSSO をタンパク質試料に添加し、近接する Lys 残基間を架橋する。これをプロテアーゼ処理後に質量分析することで、分子内・分子間での相互作用部位を網羅的に調べることができる。これを暗条件と照射条件で行い、両者の解析結果を比較することで、光依存的な構造変化部位の同定を行う。こうして得られる結果を分光解析による反応機構と統合することで、時間分解かつ空間分解で phot の動きを捉え、その活性化機構を明らかにする (図 1c)。また phot は kinase の活性により自己リン酸化することが知られるが、リン酸化部位の同定には至っておらず、リン酸化をもたらす構造変化の情報も得られていない。こうした自己リン酸化の解析も phot の活性化機構の解明に必須であるため、質量分析によるリン酸化サイトの同定を実施する。

【経過】令和 5 年度の共同研究により、*Ot-phot*

やその変異体を対象とした XL-MS 解析を実施し、配列上で架橋された部位のリストデータを得た。光照射下で架橋効率が変化する部位を複数個所観測しており、光依存的な構造変化が起こることを XL-MS 解析により捉えつつある。

また質量分析によりリン酸化状態を解析した結果、精製した時点で9か所のアミノ酸残基がリン酸化されていることがわかった。photの活性を抑える暗条件にて培養および精製を行っているが、恐らく phot の恒常的な活性により自己リン酸化が起こったと考えられる。光照射による自己リン酸化反応の解析には脱リン酸化体の調製が必要であるため、脱リン酸化酵素を共発現する系を構築し、再精製を行った。その結果、脱リン酸化体の回収に成功したため、TG法により光反応の再解析を行った。

興味深いことに、脱リン酸化体はリン酸化体に比べてコンパクトな構造を取ることや、ATP存在下で光照射を続けると徐々に構造が広がることを明らかにした。また脱リン酸化体は安定性が上昇し、分解物の少ない高純度試料の調製が可能であることもわかった。令和6年度はこの試料を用いて、XL-MS 解析およびリン酸化解析を継続する予定である。

## 【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

photの構造は解かれていないため、これまで AlphaFold2 による予測構造を基にした議論を行ってきたが、ドメイン間の配置や配向の予測精度が低いという問題を抱えていた。また AlphaFold2 では、その適用範囲が最安定構造(基底状態)の予測に限られるため、光励起によりもたらされる活性化状態の議論が困難であった。本研究では、XL-MS 解析で得られる相互作用サイトを基に予測構造を修正することで、ドメイン間の相対配置などを本来の構造に近づけることができた。また暗条件のみならず光照射下で Cross-link 処理を行うことで、光依存的に大きく構造が変わる部位を空間上にマッピングすることができた。これらの解析と分光計測を組み合わせることで、二つの LOV ドメインが暗状態で kinase の特定の部位と相互作用すること、光照射下で LOV2 の C 末端にあるヘリックスがほどけること、これにより LOV ドメインと kinase ドメインの相互作用が弱まることを見いだした。脱リン酸化体の解析によって詳細を詰める必要があるが、こうした光活性化機構に関する知見を得たことが本研究の大きな成果である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

レーザーを用いた分光手法は高い時間分解能での反応解析が可能だが、それ単独では詳細な構造情報を得ることが困難である。これを補完するために、これまで溶液 NMR による構造解析を行ってきた。しかし、NMR は解析可能な分子量に制限があるため、phot のようなマルチドメインタンパク質の解析には適用できなかった。XL-MS 解析は測定対象の分子サイズに制限がなく、光依存的に大きく構造が変わる部位を検出できるため、本研究では分光計測と質量分析の融合を行い、分子が動作する姿を時間分解かつ空間分解で可視化する。本手法の確立により、photに限らず、従来法では解析が困難であった様々な光機能性分子の動作機構の解明が期待され、得られる知見は新たな光遺伝学的ツールの開発に役立つものである。以上、本共同研究は、解析技術の創出や光操作ツールの開発など、医学・薬学研究の分野にも高い波及効果をもたらすものである。

## 【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

## 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

XL-MS により構造変化部位の解析をする際に、分子間の架橋の寄与を除去する必要がある。そのために分子間の架橋が起こらない条件検討を進めている。また架橋後に、ゲルろ過や電気泳動を行い、モノマー部分だけを解析するという方法も検討している。また XL-MS により光依存的な変化を解析する際、暗状態と光状態の架橋効率の差を調べるが、どの程度の差を有意な変化とするかの線引きが難しい。そこで既に反応機構がわかっているタンパク質について同様の解析を行い、光依存的な変化の閾値を定義するといった方法を検討している。