

# 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（京都大学大学院理学研究所）

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

本研究では、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 phototropin (phot) を対象に、その光依存的な活性化機構を、時間および空間分解能をもって解明することを目的とする。phot は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 ドメインから構成される (図 1a)。従来、その信号伝達機構は主に予測構造に基づいて議論されていたが、活性化状態に関する実験的知見は乏しかった。

本研究では、独自のレーザ一分光法（過渡回折格子(TG)法）による反応の時間分解解析と、Cross-link 質量分析 (XL-MS) による相互作用部位の空間マッピングを融合した解析手法を用い、*Ot-phot* (*Ostreococcus tauri* 由来の全長 phot) の構造動態を可視化することを試みた (図 1b)。特に本年度は、リン酸化状態を制御した試料調製と、高精度な XL-MS 解析によって、光による構造変化のメカニズムをより詳細に明らかにすることを目指した。

### [1-2] 研究の方法・経過

本年度は、まず精製時のリン酸化を抑制する目的で、脱リン酸化酵素を共発現させた系を構築し、脱リン酸化体の高純度試料を調製した。この試料を用いて MS 解析を行ったところ、リン酸化が大幅に抑制されていることが確認できた。TG 解析や X 線小角散乱 (SAXS) 解析により、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リン酸化に伴い徐々に構造が広がることがわかった。また脱リン酸化体は安

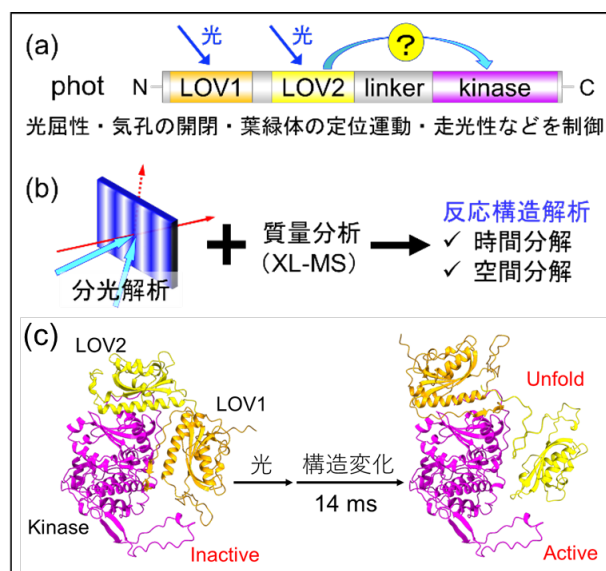


図1 (a) photの一次構造と機能、(b) 本研究で開発する技術の概念図、(c) photの反応モデルの例

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。

次に、精製した脱リン酸化体に対して光依存的にリン酸化されるアミノ酸残基を MS 解析により調べた結果、LOV1 ドメインの N 末端領域にリン酸化サイトが集中していることが明らかとなった。同様の結果が別の生物種（緑藻の一種である *Chlamydomonas reinhardtii*）由来の phot でも報告されており、リン酸化サイトは生物種を超えて保存されている可能性が示唆された。

続いて、脱リン酸化体の光依存的な構造変化を調べるために、XL-MS 解析を実施した。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、分子内および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

と光照射条件で行い、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や会合部位の同定を行うことが目的である。今年度は、分子間の架橋の影響を排除するために、架橋処理後の試料をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、モノマーとオリゴマーの画分を分けて解析を行った。これにより分子内相互作用のみに着目した高精度な解析が可能となり、昨年度得られた構造変化の傾向を再現する一方で、新たにドメイン間の相対的な配置変化を明らかにすることができた。具体的には、光照射により LOV2 ドメイン の C 末端ヘリックスが崩壊し、それに伴って LOV1 ドメインが kinase の活性部位に接近する構造変化が生じることが示された (図 1c)。この変化は、LOV1 ドメインの N 末端が光照射下でリン酸化されるという観測結果とも一致しており、phot の活性化におけるドメイン間の再配置の重要性を示している。

また、XL-MS 解析により kinase の特徴的なループ構造と LOV1・LOV2 ドメインの相互作用が観測されたため、このループを欠失させた変異体を用いた TG 測定を行った。その結果、TG 信号の強度変化が確認され、ループ構造が phot の光依存的な反応に関与していることが示された。

## 【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本研究により、TG 法と XL-MS を組み合わせた解析手法により、phot の光活性化に関する一連の構造変化過程を時間・空間の両面から明らかにしつつある。特に、比較的安定な脱リン酸化体を用いることで、光依存的なリン酸化サイトの正確な決定や、これをもたらす構造変化を実験的に捉えることが可能となった。ヘリックスの構造崩壊と LOV1 の活性部位への接近、ならびにリン酸化サイトのマッピングは、光刺激によって引き起こされる信号伝達機構を説明するうえで極めて重要である。また、kinase のループ構造の役割についても変異体解析により新たな知見が得られ、今後の機能制御への応用が期待される。

現在は、これらの成果をまとめた論文を執筆中であり、令和 7 年度中に査読付き国際誌への投稿を予定している。本研究で得られた知見は phototropin の活性化機構に関する理解を大きく前進させるものであり、光機能性タンパク質の分子科学的研究に新たな展開をもたらすものと期待される。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

XL-MS 解析によって得られる高精度な相互作用マップは、予測構造の精度を飛躍的に高めるものであり、AlphaFold などでは捉えられない動的構造の理解に資する。光照射による構造変化を空間的に捉えることで、従来の構造生物学的手法では解明が困難であった phot のような多ドメインタンパク質の動作機構に迫る道を開くものである。

この手法は phot に限らず、他の光機能性タンパク質や光操作ツールにも応用可能であり、光遺伝学や光創薬といった分野への波及効果が期待される。また、TG 法と MS 法を統合した本解析手法は、生体分子の動作原理の解明に向けた新たなプラットフォームとなる可能性を秘めている。以上から、医学・薬学研究や技術開発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

今後の課題としては、まず XL-MS 解析における分子間架橋の影響をさらに正確に排除する手法の確立が挙げられる。現時点でもモノマーとオリゴマーの分離により一定の対処を行っているが、今後はこの手法の再現性と定量性をより高める必要がある。具体的には、すでに構造変化が明らかになっている既知のモデルタンパク質に同様の XL-MS 手法を適用し、そこから得られる架橋パターンを基準にして、解析の精度や信頼性の評価を行うとともに、光依存的構造変化を有意と見なすための統計的な閾値設定を進める予定である。

また、現在取り組んでいる光依存的なリン酸化反応の時間分解測定に加えて、特定のドメインやループ構造を改変した変異体を用いた機能解析を進めることで、得られた構造変化と分子機能との因果関係の理解をより一層深めていく計画である。