

実験番号：201405043



溶液中の筋タンパク質の X 線小角散乱

杉本泰伸¹、林沙也加²、丸田晋策³、加藤一徳⁴

- 1) 名古屋大学シンクロトロン光研究センター、2) 名古屋大学大学院工学研究科、
3) 創価大学工学部、4) あいちシンクロトロン光センター

1. 測定実施日

2016年12月19日 10時 - 18時30分 (2シフト) , BL8S3

2. 概要

フォトクロミック分子を ATP 類似物質として合成し、筋タンパク質であるミオシンと結合させて時分割 X 線小角散乱でその構造を調べた。可視光照射後から慣性半径は変化して約 60 秒後で定常状態に達し、およそ 1.2 Å 増大した。モデル解析による構造は、ATP 加水分解反応の中間体における構造変化と対応するものであった。

3. 背景と研究目的

ミオシンは筋肉などに含まれ、アクチン繊維と相互作用しながら運動するモータータンパク質である。ミオシンの頭部ドメイン (サブフラグメント-1、S1) には ATP 加水分解能があり、これに伴う構造変化がアクチン繊維上での変異を生み出し、モーター機能と直接関連していると考えられている[1]。本研究では、ATP 類似物質として合成したスピロピラン誘導体 SPETP を S1 と結合させた複合体の構造を、X 線小角散乱法で調べることを目的とした。SPETP はフォトクロミック分子の一種であり可視光や紫外線によって異性化しその構造が可逆的に変化する。外部からの光照射による ATP 類似物質の構造と、それを結合したタンパク質の構造の関連を調べることを目的とした。

4. 実験内容

ニワトリ骨格筋よりミオシンを単離し、パパインによる切断で頭部フラグメント S1 を調製した。S1 溶液は ~5 mg/mL の濃度とし、SPETP の濃度は 5 mM

を測定直前に加えた。これらの試料を用い、あいちシンクロトロン光センタービームライン BL8S3 において小角散乱実験を行った。試料温度 20 °C、カメラ長を ~2200 mm、波長 0.9 Å の条件で、Pilatus 100K を検出器として用いた。測定は 12 秒間隔で 20 サイクルの時分割で行った。S1-SPETP 複合体を測定前に紫外線照射した状態で暗条件に保った実験ハッチ内に設置し、測定開始 60 秒後から試料に対して可視光を照射し続けて、240 秒まで X 線散乱の測定を行った。コントロールとして SPETP を結合しない S1 单体についても、光照射をした時分割 X 線小角散乱を測定した。

5. 結果および考察

測定した 2 次元の散乱パターンを時間フレームごとに円環平均し、1 次元の散乱曲線を得た。溶媒との差を取り S1 分子の散乱を求めた後、ギニエ解析を行って慣性半径を求めた。慣性半径の時間変化を Fig.1(a)に示した。コントロールの S1 单体では、60 秒から可視光照射を行っても慣性半径の変化は観測されず、全体での慣性半径の平均値は 48.1 Å であった。一方、SPETP-S1 では可視光照射前の慣性半径の平均値が 43.9 Å であり、60 秒からの光照射によって慣性半径が増大することが観測できた。定常状態に達していると思われる 130-240 秒の平均で慣性半径は 45.1 Å であった。また、照射前後のそれぞれで得られた散乱強度曲線をもとにして、ab initio 法[2]による球充填構造モデルを構築した。得られた構造モデルをメッシュ表示で Fig.1(b)に示した。光照射の前後で先端部の角度が異なり、S1 の ATP 加水分解反応中間体で見られたような構造変化が生じていることが観測できた。すなわち、外部からの光照射により、モーター機能と関連した ATP 加水分解反応と同様の構造変化を S1 に起こすことができる可能性が示唆された。

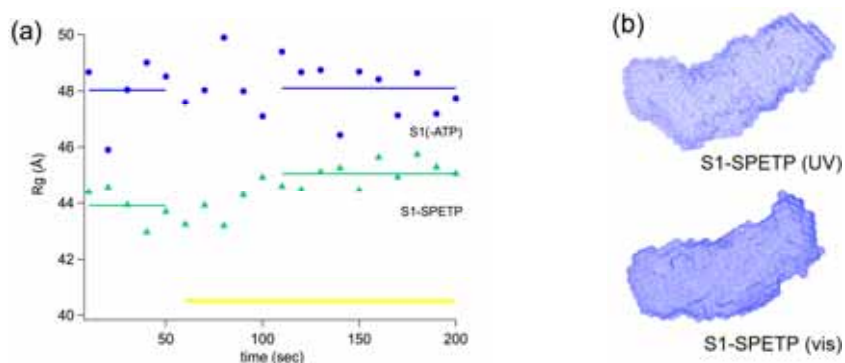


Fig.1 (a)時分割 X 線小角散乱で S1-SPETP の慣性半径の変化を示した。黄色線で可視光を照射。(b)可視光照射前(UV)と照射後(vis)の S1-SPETP の構造モデルを示した。

6. 今後の課題

本課題では、紫外線状態から可視光を照射した SPETP の異性化に伴う、S1 の構造変化を小角散乱により測定した。SPETP および SPETP を結合した S1 の紫外光、可視光による異性化は、可逆性であることが分光学的手法などで確認できている。今後は X 線小角散乱実験においても可視光状態から紫外光を照射して同様の測定を行い、可逆性を示すことを行う予定である。また、より広い Q 領域での測定を行い、高分解能の構造モデルを考察する予定である。

7. 参考文献

- [1] M.A.Geeves & K.C.Holmes, *Biochem.* 68, 687-728 (1999), J.A.Spudich, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 387-392 (2001)
- [2] D.I.Svergun, *Biophys. J.* 76, 2879-2886 (1999)