

コントラスト同調中性子小角散乱による時計蛋白質複合体の部分構造解明

Structural analysis of the partial conformation in the clock protein complex with contrast matching-small angle neutron scattering

柚木 康弘¹⁾

守島 健¹⁾

杉山 正明¹⁾

Yasuhiro YUNOKI

Ken MORISHIMA

Masaaki SUGIYAMA

¹⁾京都大学複合原子力科学研究所

概要

シアノバクテリアの概日時計システムにおいて、時計蛋白質 KaiA と KaiC が形成する AC 複合体は、KaiC のリン酸化促進に重要な役割を果たす。したがってリン酸化促進機構の詳細な理解のためには、AC 複合体の構造を解明することが必要である。本実験では特に AC 複合体中の KaiA の部分構造の解明を目的とした。この目的のために、KaiC を散乱的に不可視化したコントラスト同調-中性子小角散乱 (CM-SANS) を行った。ここで、KaiA と KaiC の溶液中では KaiA と KaiC が解離会合平衡状態にあり、KaiC と未会合の KaiA も存在する。そこで我々は、AC 複合体中の KaiA と未会合の KaiA の存在比率を超速心分析 (AUC) で明らかにし、CM-SANS で得られた散乱プロファイルから AC 複合体中の KaiA に対応する散乱プロファイルを導出した。得られた散乱プロファイルに対して Guinier 解析で得られた回転半径は、単独状態の KaiA の回転半径と誤差範囲内で一致することが判明した。したがって、KaiA は AC 複合体中でも単独状態の KaiA と比較して大きな構造変化がないことが示唆された。

キーワード：時計タンパク質、コントラストマッチング-中性子小角散乱 (CM-SANS)、超速心分析-小角散乱複合解析 (AUC-SAS)

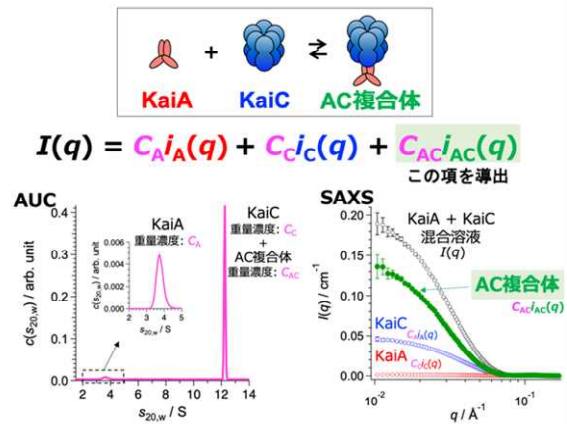
1. 目的

シアノバクテリアの概日リズムは、3 つの時計蛋白質 KaiA・KaiB・KaiC で制御される。KaiC はアデニン三リン酸存在下で、KaiA、KaiB との相互作用によって、自律的に 24 時間周期のリン酸化・脱リン酸化反応を行う。特に KaiA と KaiC で形成する AC 複合体は KaiC のリン酸化の促進に重要であるが、その機構の詳細は未解明である。この課題に対して我々は AC 複合体の構造の観点からリン酸化促進機構の解明に取り組んでいる。これまでに、AC 複合体全体に対応する散乱プロファイルを X 線小角散乱 (SAXS) と超速心分析 (AUC) の複合解析 (AUC-SAXS^[1]) によって導出した (Fig. 1 (a))。この散乱プロファイルを再現する構造を計算機シミュレーションによって探索し、KaiA と KaiC の相対配置についての情報を得た。更に詳細な構造情報を得るために、本実験では AC 複合体中における KaiA の部分構造を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

AC 複合体中の KaiA の部分散乱プロファイルを得るために、KaiC を散乱的に不可視化したコントラスト同調-中性子小角散乱 (CM-SANS) を行った。具体的には、42%D₂O 溶媒中で軽水素体の KaiC (h-KaiC) と 100%重水素化 KaiA (d-KaiA) を混合した溶液に対する SANS 測定を行った。しかし、この溶液中では KaiA と KaiC が解離会合平衡状態 (KaiA + KaiC ⇌ AC 複合体) にあり、KaiA・KaiC・AC 複合体の三成分が共存する。そのため、

(a) AUC-SAXS



(b) AUC-CM-SANS

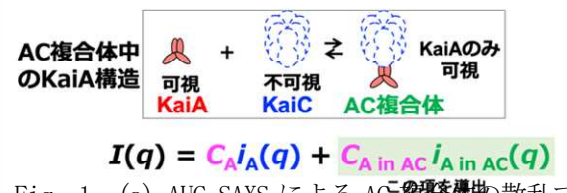


Fig. 1. (a) AUC-SAXS による AC 複合体の散乱プロファイルの導出。AUC で得られた沈降係数分布 (マゼンタ) と SAXS で得られた KaiA+KaiC 混合溶液 (黒)、KaiA (赤)、KaiC (青) の散乱プロファイルを用いて、AC 複合体の散乱プロファイル (緑) を導出した。(b) AUC-CM-SANS によって求める AC 複合体中の KaiA の部分散乱プロファイル。

CM-SANS で得られる散乱プロファイルは AC 複合体中の KaiA と未会合の KaiA の集団平均に相当する。そこで我々は、超遠心分析 (AUC) で得られる各成分の重量分率を使って、CM-SANS で得られる散乱プロファイルから AC 複合体中の KaiA の部分散乱プロファイルを選択的に導出した。(AUC-CM-SANS; Fig. 1(b))。

CM-SANS 測定は JRR-3 に設置の SANS-J を用いて、試料検出器間距離 4m 及び 2m、波長 6.5Å、温度 30°C で行った。AUC 測定は京都大学複合原子力科学研究所に設置の ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) を用いて、レイリー干渉光学系、回転速度 60000rpm、温度 30°C で行った。

3. 結果及び考察

Fig2 に 42%D₂O 溶媒中で測定された d-KaiA 単独溶液 (マゼンタ丸印) と、AUC-CM-SANS で導出された AC 複合体中の KaiA の部分散乱プロファイル (青丸) を示す。両者は 0.01 - 0.2 Å⁻¹ の q 領域でプロファイルの形状が一致した (Fig2(a))。また、Guinier 解析によって得られた回転半径 R_g も誤差範囲内で一致した。KaiA は N 末端ドメインと C 末端ドメインがリンカーで接続しており、溶液中では C 末端ドメイン同士で会合した 2 量体が基本単位である。リンカー部分はフレキシブルなため、N 末端ドメインの配置は溶液中で揺らいでいる可能性がある^[2]、本実験の結果からは AC 複合体中の KaiA と単独状態の KaiA の間で、この N 末端ドメインの配置に由来する大規模な構造の差異は確認されなかった。今後は、僅かな違いが統計誤差に埋もれている可能性や、高分子量である KaiC の微小なコントラストミスマッチの影響について検証を進める予定である。

4. 参考文献

- [1] K. Morishima *et al.*, *Commun. Biol.* **3**, 294, (2020).
 [2] Y. Yunoki *et al.*, *Commun. Biol.* **5**, 184, (2022).

5. 謝辞

本実験にご協力いただいた日本原子力研究開発機構の中川洋博士に厚く御礼申し上げます。

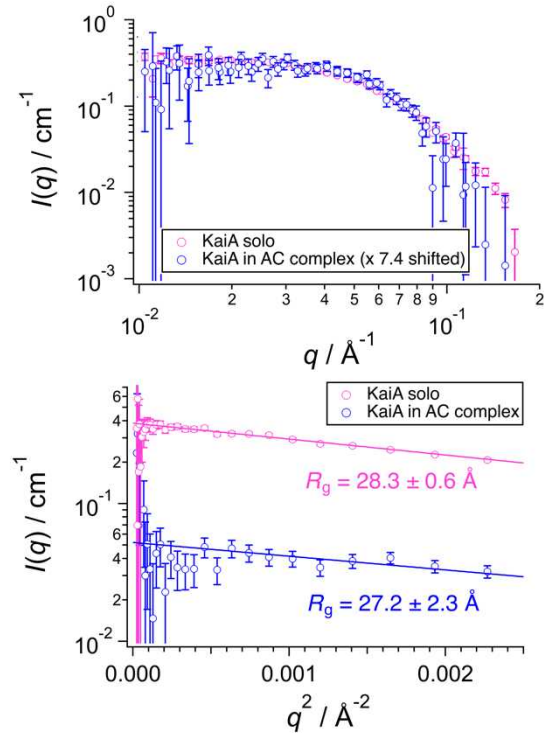


Fig. 2. (a) 42%D₂O 溶媒中で測定された d-KaiA 単独溶液 (マゼンタ丸印) と、d-KaiA+h-KaiC 混合溶液の測定結果から AUC-CM-SANS で導出された AC 複合体中の KaiA の部分散乱プロファイル (青丸)。 (b) 上記の各散乱プロファイルに対する Guinier プロット。実線は Guinier 近似式による最小自乗フィッティング直線。