

## 青色光センサー蛋白質フォトリロピンの光反応分子機構と

## その熱力学的ダイナミクス

(京大院理<sup>1</sup>、大阪府大院理<sup>2</sup>) ○中曾根 祐介<sup>1</sup>、永徳 丈<sup>1</sup>、松岡 大介<sup>2</sup>、直原一徳<sup>2</sup>、徳富 哲<sup>2</sup>、寺嶋 正秀<sup>1</sup>

【序】青色光受容蛋白質は多種多様な機能を有するが、光受容を担うドメインの構造や反応には多くの共通点が見られる。本研究で取り扱うフォトリロピンは、分子間・ドメイン間でのシグナル伝達を担う光受容ドメインとして“LOVドメイン”を有しており、その反応分子機構は多くの興味を集めている。一般に蛋白質のシグナル伝達はいくつかのステップを介して達成されるため、その全貌を明らかにするためには時間分解能に優れた手法が必要となる。従来の時間分解測定は過渡吸収測定が主であったが、この手法では発色団近傍の変化を観測するに止まり、機能発現に重要な蛋白質全体の構造変化や会合・解離反応は捉えきれない。そこで我々は、光反応に伴う蛋白質の体積変化や拡散係数変化を高い時間分解能で測定可能な過渡回折格子法 (TG 法) を用いることで、こうした問題を解決し、蛋白質が光を受け取ってから機能を発現するまでの詳細なメカニズムに関する考察を行った。

フォトリロピンは植物体内で光屈性などの生理現象を制御する青色光受容蛋白質である。その構造は光受容を担う二つの LOVドメイン (LOV1、LOV2) と、活性化反応を示す Ser/Thr キナーゼドメイン、さらに LOV2 とキナーゼを結ぶ linker から構成されている。LOV2 が光を受けると、蛋白質内でシグナル伝達が行われキナーゼが活性化すると考えられているが、その反応機構に関しては未だ明らかにされていない。そこで光照射後の構造変化に関する知見を得るために、LOV1 ドメイン単体 (LOV1 試料)、LOV2 ドメイン単体 (LOV2 試料) と、さらに LOV2 ドメインに linker を付随させたもの (LOV2-linker 試料) (図1) を用いた研究を行った。

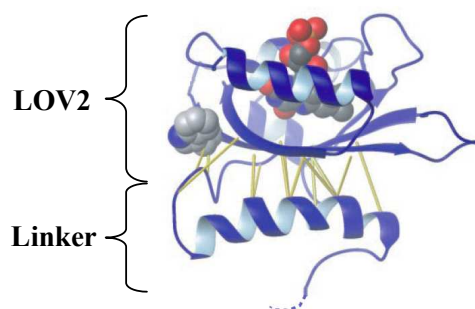


図1 LOV2ドメインとLinker部分の3次構造 (Harper et al. Science. 2003)

【実験】シロイヌナズナの LOV1 試料、LOV2 試料、LOV2-linker 試料を用いて、その光誘起反応を、TG 測定により調べた。

【結果】波長 465nm のパルス光で励起した後の TG 信号を図2に示す。それぞれの試料で発色団近傍の構造変化に起因する吸収スペクトル変化による信号 ( $\sim 2 \mu s$ ) と、励起分子から放出された熱の拡散信号が比較的早い時間スケール ( $\sim 100 \mu s$ ) で観測された。その後の信号は、減衰時定数に格子波数  $q$  依存性がみられたことから蛋白質分子が溶液中を拡散していく過程を反映した信号であると同定され、興味深いことにこの拡散信号の形や強度が時間変化することが明らかになった。この分子拡散信号は、光励起により得られる生成物の拡散係数を情報として含んでおり、その形や強度に時間変化が観測されたことは、拡散係数変化を伴う蛋白質全体の構造変化が光照射によって誘起されていることを意味している。全ての試料でこの拡散係数変化が観測されたが、その特徴には大きな違いが見られた。まず LOV1 試料、LOV2 試料では、拡散係数変化を伴う反応

の速度が蛋白質濃度を下げるに依り遅くなる様子が検出された(時定数: 10ms~50ms)。このことから観測された反応は多分子反応であると示唆され、解析の結果、凝集反応(ダイマー化反応)が光誘起されることが明らかになった。また LOV2 試料に関しては蛋白質濃度を高くすることによって、暗状態でもダイマーが溶液中で形成され、光励起によって解離しモノマーになる様子が観測された(時定数~300  $\mu$ s)。これらの結果からドメイン間の相互作用変化がシグナル伝達において重要な役割を持っていることがわかる [1]。一方、LOV2-linker 試料ではダイマー・モノマー間での解離・結合反応は観測されなかったが、分子内でのドメイン間の解離反応(時定数~300 $\mu$ s)とそれに続く大きな拡散係数変化が光励起後 1ms の時定数で観測された。CD測定した結果、光照射により linker 部分のヘリックスが失われることがわかったが、この反応により溶媒との相互作用が強まり、拡散係数が大きく変化したと考えられる。以上から linker 部分のヘリックス崩壊という劇的な反応が光照射後 1ms で誘起されると結論づけられる。

これら蛋白質全体の反応は過渡吸収測定では捉えられていないことから、吸収変化を伴わない”spectral silent”な反応であると言える。特に LOV2-linker 試料で観測されたヘリックス崩壊反応は、光情報伝達に重要な役割を担っていると考えられる。NMR を用いた研究により、LOV2 と linker が疎水性相互作用により結合しており、光照射によりこの相互作用が壊れ、解離すると報告されているが [2]、本研究で観測された LOV2(ダイマー)の解離反応と LOV2-linker の解離反応(時定数 300  $\mu$ s)がこの相互作用変化に対応していると考えられる。これら一連の時間分解反応検出は、シグナル伝達過程を直接捉えていることに他ならない。

また TG 法では短寿命な過渡的分子種に対して、そのエンタルピーや体積変化量を定量することが可能である。そこで我々は観測された反応中間体の熱力学量を測定し、その温度変化を評価することによって、熱容量や熱膨張率といった蛋白質分子の表面構造や揺らぎに関する情報を得ることも同時に行っている。本討論会では、これらの結果を基に LOV ドメインが光を受け取ってからキナーゼドメインが活性化されるまでのシグナル伝達機構に関する議論を行う。

#### 参考文献

- [1] Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima., *Biophysical Journal*, 91 (2): 645-653, 2006,
- [2] S. M. Harper, J. Christie, K. H. Gardner. *Biochemistry*. 43: 16184-16192, 2004.

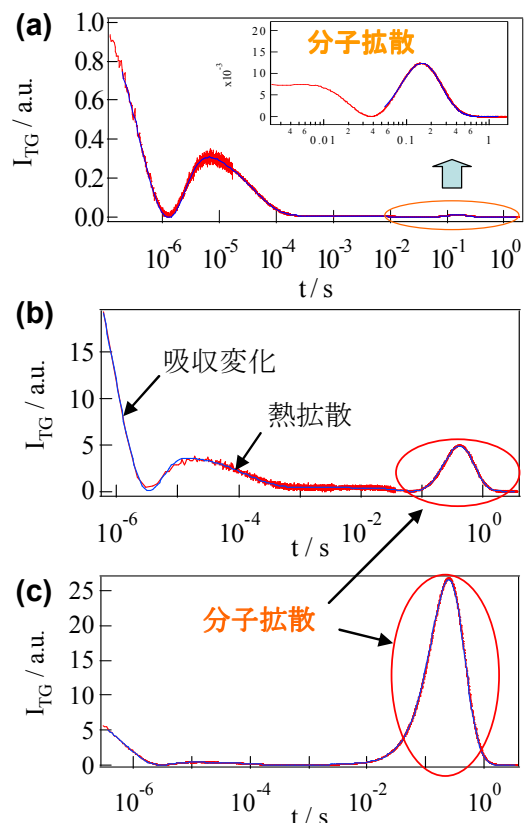


図2 (a)LOV1、(b)LOV2、(c)LOV2-linkerのTG信号