

アナベナセンサリーロドプシンの光反応機構と 蛋白質間相互作用ダイナミクスに関する研究

(京大院理¹・東工大資源研²・テキサス大生化分生³) ○近藤正人¹・井上圭一²・佐々木純³・SPUDICH J. L.³・寺嶋正秀¹

【序】アナベナセンサリーロドプシン (ASR : 図1) は近年、真正細菌において発見された微生物型ロドプシンである¹⁾。これら微生物型ロドプシンには、イオンポンプや光センサーとしての機能をもつものがあるが、ASR は光センサーの役割を担っており、周囲の光環境を感知し、これに応じて光合成系における光捕集系の調節を司ると考えられている。機能発現において重要となるのは細胞内に存在する水溶性のトランスデューサー蛋白質 (14 kDa protein ; Tr) への伝達過程である。このような信号伝達は蛋白質間の相互作用を通して行われ、高次の構造変化といった形で現れるが、こうした蛋白質の構造変化は吸収変化を伴わないことが多いため、実験的観測は困難であった。今回、この ASR の反応に伴う構造変化と蛋白質間での相互作用ダイナミクスを過渡回折格子 (TG) 法を用いて検出することを試みた。まず、ASR 自体の光反応サイクルに伴う構造変化を TG 法で詳細に調べた。他のセンサータンパク質と違い、ASR では発色団であるレチナールの all-trans 型と 13-cis 型との存在比が光条件によって変動することが、分光学的研究を困難にしている。そこで、発色団が all-trans 型から反応が起こる場合と 13-cis 型から反応が起こる場合の反応過程の違いを明らかにするために、明条件と暗条件で TG 測定を行い光サイクルの検討を行った。これをもとに、ASR の溶液に Tr を加えたときの信号の変化を観測し、センサー部位からトランスデューサー蛋白質への信号伝達過程について調べた。

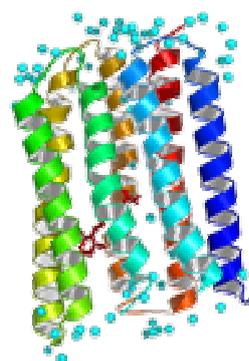


図1 ASR の結晶構造

【実験】(i) TG 法では、2本の pump パルス光(532 nm)で励起し、cw の probe 光(840 nm)を用いて濃度の空間変調を検出した。本研究に関しては TG 信号への寄与は屈折率変化によるものだけである。

(ii) 試料溶液には ASR を界面活性剤を用いて可溶化したものここに Tr を加えたものの2種類を用意し、これらそれぞれを暗条件、明条件において測定した。ここで、暗条件の試料としては6時間以上暗室においたものを使用し、明条件には橙色光 (> 570 nm) を5分照射することで明順応させたものを使用した。

【結果と考察】

① ASR の光反応機構

暗条件、明条件における ASR 溶液の光励起後に観測された TG 信号を図2に示した。

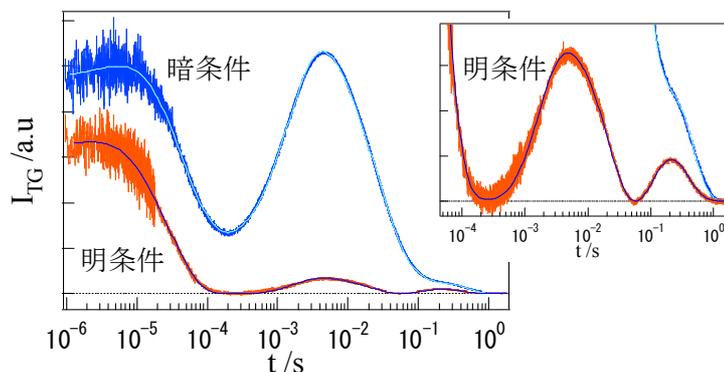


図2 ASR の TG 信号 ($q^2 = 1.1 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)

図に示したように暗条件と明条件では信号強度に大きな変化が見られたほか、その時間変化にも違いが見られている。ASR の発色団であるレチナール分子は、暗条件では all-trans 型が、明条件では 13-cis が支配的であることが分かっている²⁾。このことを考えると、暗条件における大きな TG 信号は主に all-trans 型からの光反応の寄与であり、明条件における信号強度の減少は、明順応にともなってその割合が減ったことにより説明される。また、時間変化が暗条件と明条件で異なっていることは、13-cis の光反応も存在するという事実を明確に示している。

暗条件での信号から、all-trans 型の光反応を調べた。信号の早い時間領域 (~ 60 μs) には、熱グレーティング信号の熱拡散による減衰が見られている。数 100 μs から数 100 ms にかけて、立ち上がり減衰からなる大きな山型信号が観測されているが、これらの信号は 1.3 ms、52 ms という q^2 に依存しない時定数を持ち、それぞれ M 中間体と呼ばれる過渡種の形成と減衰過程にともなった吸収変化を反映した信号であると同定された。更に、 q^2 を変化させ、観測の時間スケールを変えた測定から、より早い時間領域において、K から L 中間体への遷移過程も観測され、all-trans 型からの光反応では他の微生物型ロドプシンと類似した光サイクルをもつことが分かった。さらに、M 中間体が減衰した後の 100 ミリ秒以降にも信号が観測されており、より長寿命中間体の存在も明らかになった。この最後の部分の信号は、分子拡散を表しており、その減衰速度定数から、拡散係数が $3.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と求められた。

一方、明条件での 13-cis 型の光反応による TG 信号はかなり弱く、しかも all-trans 型の光反応のよる信号が重なっていて、解析を複雑にしている。しかし、詳細な解析の結果、暗条件では見られなかった約 6 ms、200 ms の時定数をもつダイナミクスが存在する事が分かった。これらは 13-cis 型の光反応における中間体と考えられる。また、時間的に一番遅い部分の信号は、かなり暗条件での信号と異なっており、これは反応分子と生成分子が暗条件と明条件ではちょうど逆の関係にあるとして解析できることが分かった。即ち、all-trans レチナールからは 13-cis レチナールが、13-cis からは all-trans が生成していることがわかる。

②ASR とトランスデューサー蛋白質間における相互作用ダイナミクス

光センサーとしての機能を考えると、ASR だけの光反応だけでなく、信号を伝達するトランスデューサー蛋白質との相互作用の変化の検出が重要となる。図 3 に ASR および ASR に Tr を加えた場合の TG 信号を示した。図に示したように、Tr を加えたことで、早い時間領域では熱グレーティング強度の変化が見られ、遅い時間領域においても信号の立ち上がり速度と減衰速度に変化が見られた。よって、Tr との相互作用の結果、ASR の光反応の比較的早い時間領域でその影響が現れていることが分かり、光サイクルの時定数も修正を受けることが明らかになった。一方、一番遅い時間スケールに現れる分子拡散信号にも変化が現れ、このことは Tr との相互作用によって拡散係数が影響を受けることを示すものであり、構造変化との関係で非常に興味深い現象である。現在、この時間領域に注目して測定・解析を進めており、こうした結果もふまえて、講演で議論する。

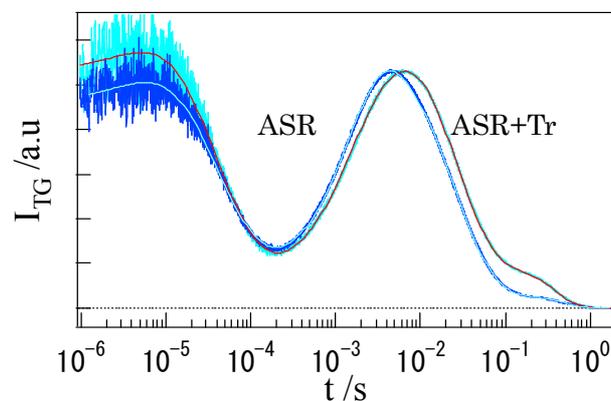


図 3 暗条件 ASR に Tr を加えたときの TG 信号の変化

【参考文献】

- 1) Molecular Microbiology (2003) 47(6), 1513-1522
- 2) J. Biol. Chem. (2005) 280, 14663-14668