

## 2C17

### 時間分解拡散検出による青色光センサータンパク質 PixD の光反応機構

(京大院理<sup>1</sup>、東大院総合文化<sup>2</sup>、阪府大院理<sup>3</sup>) ○田中啓介<sup>1</sup>、中曽根祐介<sup>1</sup>、岡島公司<sup>2,3</sup>、池内昌彦<sup>2</sup>、徳富哲<sup>3</sup>、寺嶋正秀<sup>1</sup>

【序】PixDはシアノバクテリアの走光性の調節に関わる青色光センサータンパク質である。青色光の受容のために、発色団としてフラビンを結合するBLUF (sensors of Blue Light Using FAD)ドメインを持ち、その光反応機構が近年多くの興味を集めている。PixDの光反応は主に吸収スペクトル変化から調べられているが、それによると青色光照射後サブナノ秒で吸収がレッドシフトした中間体が生成し、数秒で基底状態へ暗回復するという光サイクル反応が報告されている。しかしながら、光情報を伝達し、機能を発現するに至る際、本質的に重要な役割を演じるのは動的な高次構造変化であり、その反応機構の全貌を明らかにするためには高い時間分解能でタンパク質全体の構造変化を検出することが不可欠となる。そこで我々は、タンパク質構造を反映する物理量である拡散係数に着目し、PixDの光反応機構について検討した。具体的には、過渡回折格子(TG)法を用い、光誘起拡散係数変化を時間分解検出することによって、PixDの構造変化ダイナミクスを調べた。

さらに、図1に示すように、PixDは環状の五量体が二つ重なって十量体を形成することが結晶解析により明らかにされている。生体内において、こうしたオリゴマー構造が光受容や情報伝達過程に対して重要であると考えられており、その役割を考察するために、拡散係数変化を表す信号の濃度や励起光強度依存性を調べた。

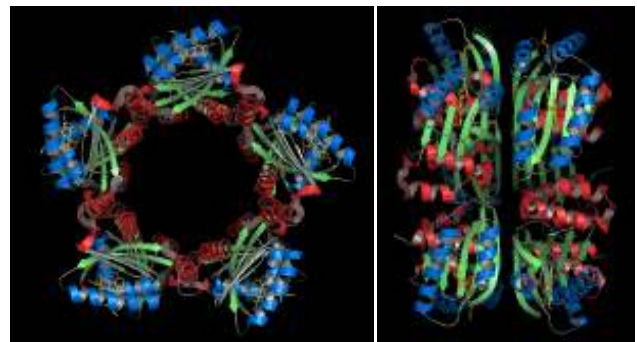


図1. PixD の結晶構造: (左) 正面図、(右) 側面図.

【実験】測定試料には好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1由来のPixD (TePixD)を大腸菌において発現、および精製したものを主に用いた。TG測定では、波長465 nmの色素レーザーを励起パルス光、840 nmのダイオードレーザーをプローブ連続光とした。

【結果と考察】図2にTePixDを青色光で励起した後観測されるTG信号を示す。早い時間領域の減衰は励起分子から放出された熱の拡散による信号である。その後、過渡吸収では検出されないTePixDの構造変化を反映した2つのダイナミクスが観測された。1つは40  $\mu$ sの時定数をもつ減衰であり、体積膨張を表す信号に帰属された。もう1つは光誘起の拡散係数変化によるダイナミクス

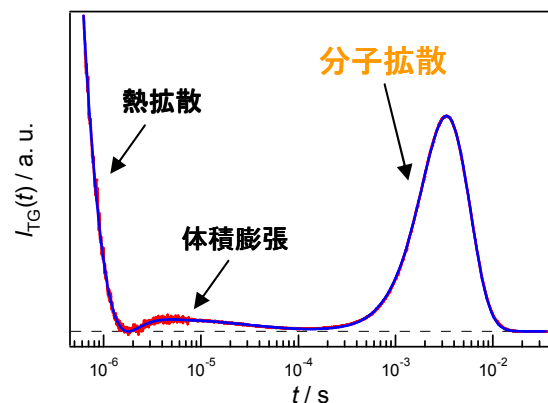


図2. TePixD の TG 信号.

である。ミリ秒領域の山型の信号がそれを反映したものであり、光反応生成物の拡散係数が反応物と異なるために山型の信号として観測される。詳細な解析の結果、拡散係数が $4.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ から $3.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ へ減少するような反応が光誘起されることが明らかとなり、その時定数は4 msと決定された。以下に、この拡散信号に与える濃度および励起光強度の依存性についての結果と考察を述べる。

### (i) 濃度依存性

拡散信号の強度は、濃度の減少に伴って減少した。このことは、拡散係数変化を起こす分子数が濃度減少に伴って減少することを示している。ゲル濾過による分子量測定によると、TePixDは暗状態で五量体と十量体の間に平衡が存在し、高濃度では十量体の割合が増えることが明らかとなった。これらの結果を合わせて考えると、観測された濃度依存性は、光照射によって十量体のみが構造変化することを示していると解釈できる。

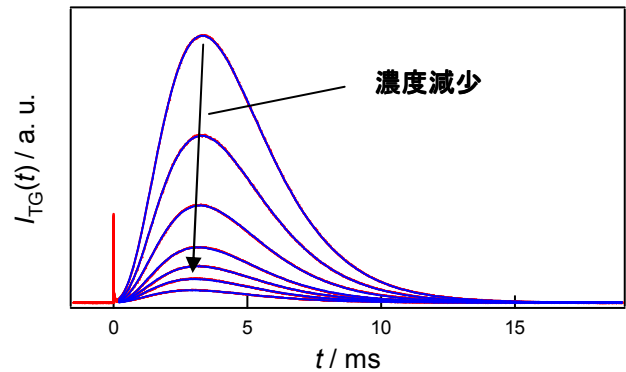


図3. 拡散信号の濃度依存性.

### (ii) 励起光強度依存性

興味深いことに拡散信号の強度は、ある励起光強度までは増加し、それ以上では減少した。過渡吸収でモニターした発色団の反応量は励起光強度には依存しなかったため、拡散係数変化を伴う反応の量子収率が励起光強度に依存すると解釈された。光子密度と試料濃度の比較から、十量体中の一個を励起した時にのみ構造変化し、分子内で複数個の発色団が励起されるとその反応が起こらなくなることが示唆された。

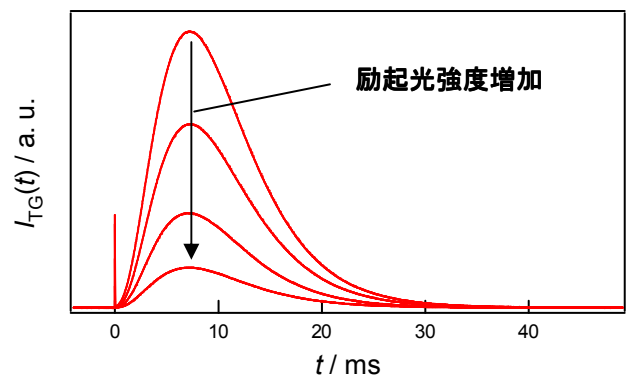


図4. 拡散信号の励起光強度依存性.

また、常温性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のもつPixDであるSyPixDについても同様の拡散検出による光反応機構の研究を行っているが、この場合にも拡散係数変化を示す信号が観測されている。さらに、励起光強度に対してもTePixDと同様、興味深い挙動を示すことが分かった。

以上のように、従来の吸収スペクトル変化だけでは捉えきれない、“spectrally silent”な反応機構を時間分解拡散検出法により明らかにした。特に励起光強度依存性の実験から、分子内に多数の発色団を持つPixDの特徴的なオリゴマー構造が光反応に影響を与えることを明らかにしたが、これは光センサー機構においても重要な意味をもつものと考えている。