

2C18

クリプトクロム/光回復酵素の光誘起構造変化ダイナミクス

(京大院理¹・Scripps²・阪大医³)○近藤正人¹・人見研一²・E. D. Getzoff²・藤堂剛³・寺嶋正秀¹

【序】クリプトクロム (Cryptochrome;CRY : 図 1) と光回復酵素はともに多くの生物に存在する青色光センサーである。これらはアミノ酸配列において高い相同性を持っており、クリプトクロム/光回復酵素ファミリーと呼ばれる蛋白質群を形成しているが、両者の機能は大きく異なっている。CRY は植物においては茎の伸長などの光形態形成を、動物においては概日リズムの調節を行っている。これに対して、光回復酵素は紫外線照射により損傷をうけた DNA を修復する機能をもつ。多くの先行研究により、CRY および光回復酵素の光化学反応においては、発色団である FAD の酸化還元状態が重要であることが認識されている。しかし、光反応において蛋白質が全体としてどのように変化し、機能に関わっていくのかといったことは全く分かっていない。生体分子の光反応機構を理解するためには、こうした発色団の化学状態変化やその近傍の局所的な光反応ダイナミクスに加え、それに導かれる蛋白質分子の全体的な反応ダイナミクスをとらえることは不可欠となる。本研究では過渡回折格子 (TG) 法を用いて、分子体積や拡散係数の観点から蛋白質反応の全体像を観測することで、CRY および光回復酵素の光反応とその違いを明らかにすることを目指した。

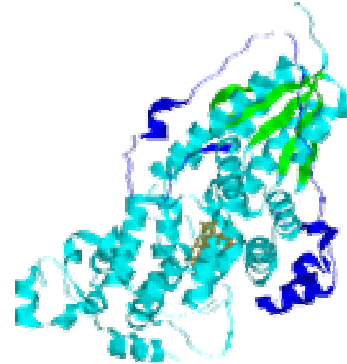


図 1 CRY の結晶構造 (Synechosystis 由来)

【実験】(i)二本の励起光で作った干渉縞によって分子を光励起し、ここに probe 光を入れることで得られる回折光(TG 信号)強度の時間変化を光電子増倍管で検出した。信号強度は溶液の屈折率変化(δn)の二乗に比例し、その時間形状は指数関数の和、 $I_{TG}(t) = \sum_j \{\delta n_j \times \exp(-k_j t)\}^2$ で表される。j 番目の信号が拡散に対応するとき、その速度定数は拡散係数 D_j 、格子波数 q を用いて $k_j = D_j q^2$ と表される。

(ii) 今回研究の対象としたのはアフリカツメガエル(Xenopus)由来の CRY (XCRY)および光回復酵素である。XCRY は DASH 型と呼ばれる CRY の新しい分岐種である。TG 測定は pH8.0 の 50 mM Tris 緩衝液中(0.3 M の NaCl、5% (v/v) glycerol を含む)で行った。XCRY および光回復酵素の光反応を開始させる励起光源には YAG レーザー(355 nm)を用い、屈折率変化をモニターする probe 光にはダイオードレーザー(780 nm)を用いた。

【結果と考察】

①XCRY の光反応ダイナミクス

XCRY の光励起後に観測される TG 信号を図 2 に示した。早い時間領域(~ 10 μ s)に見られる強い減衰信号は励起された試料から放出された熱による信号(thermal grating)の熱拡散による減衰過程であり、その後に見られる信号が XCRY の光反応に由来する信号(species grating)である。信号の格子波数依存性から、50 -100 μ s にかけて現れている減衰成分は 70 μ s の時定数をもつ反応を表わし、数 10 ms 領域に現れる遅い山型信号は分子拡散を表す信号であること

がわかった。これまでに XCRY の光反応はほとんど調べられておらず、特に反応ダイナミクスに関する研究例は全くない。今回、XCRY が光励起により約 70 μs の寿命を持つ中間体を形成することが始めて明らかになった。また、拡散信号の速度定数から、反応物、生成物の拡散係数がそれぞれ $5.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ 、 $1.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ と決められ、この測定条件では、光反応により拡散係数が大きく変化することがわかった。では、この観測された拡散係数の変化は何を表わすのであろうか。これまでの他の光受容蛋白質の研究より、蛋白質部分での高次構造の変化による分子間相互作用変化、あるいは光誘起により会合反応が起こった可能性が考えられる。原因を明確にするために、光強度依存性や濃度依存性を用いた検討を現在進めている。

②光回復酵素の光反応ダイナミクス

光回復酵素の光励起後に観測された TG 信号を図 3 に示した。熱拡散による減衰($\sim 100 \mu\text{s}$)後は、100 μs 領域で観測される弱い減衰と、10 ms 領域に見られる減衰からなる。格子波数依存性から、前者が約 7 m の時定数をもつ反応、後者が分子拡散信号であることがわかった。信号の挙動は XCRY のものとは大きく異なっている。特に際立つのは、遅い時間領域の分子拡散信号の違いである。XCRY で山型信号として観測された拡散信号が光回復酵素では小さな減衰信号として観測されている(図 3 点線)。この立ち上がりの無い減衰型の拡散信号は生成物と反応物が同じ拡散係数を持ち、同じ時間スケールで拡散するために現れたと解釈される。すなわち、この拡散信号の変化は XCRY で見られた拡散係数を大きく変えるような蛋白質部分の反応が光回復酵素の光反応においてはみられないということ反映している。このように、XCRY と光回復酵素は蛋白質全体の反応において異なるダイナミクスを示すことが明らかになった。

こうして XCRY と光回復酵素が蛋白質全体反応において異なる挙動を示すことが明らかにされた。この分子論的機構を明らかにし、XCRY と光回復酵素の違いを調べることで、蛋白質全体の反応ダイナミクスの観点から、機能の違いとのかかわりを議論することができるようになることを期待している。講演では、これらの結果をふまえて、XCRY と光回復酵素の蛋白質全体構造の観点からみた光反応機構の詳細を議論する。

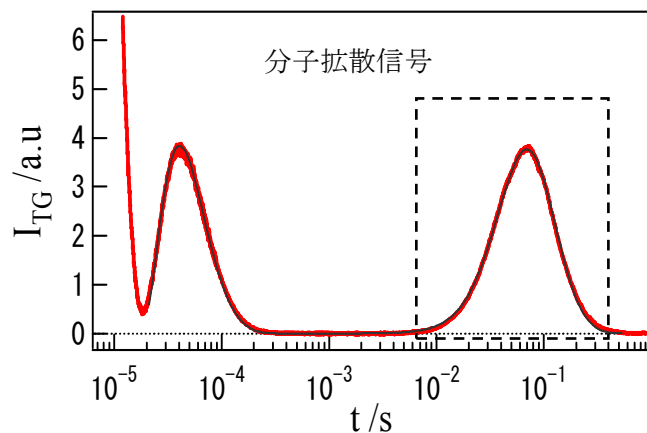


図 2 XCRY の TG 信号($q^2 = 7.14 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)

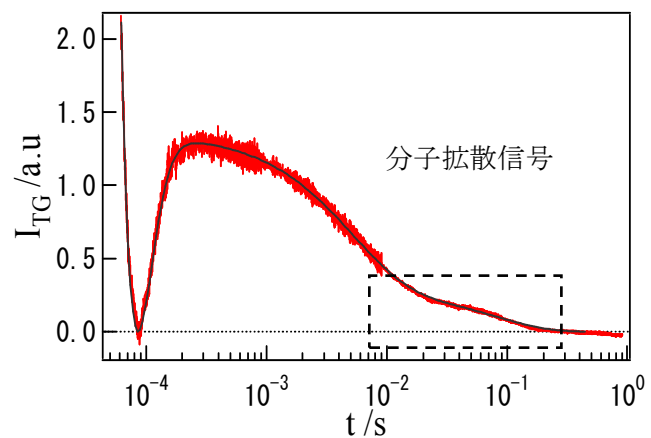


図 3 光回復酵素の TG 信号($q^2 = 2.39 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)