

3P052

光センサータンパク質フォトトロピンの光反応に対する Crowding 効果の検討

(京大院理^{*}, 大阪府大院理^{**}) 豊岡継泰^{*}, 中曽根祐介^{*}, 直原一徳^{**}, 徳富 哲^{**}, 寺嶋正秀^{*}

【序】生体内では様々な高分子種が高濃度で混在しており、このような混み合った環境を Crowding 環境と呼ぶ。Crowding 環境は様々な影響を分子に与えるが、最も重要なのは排除体積の効果である。高分子による立体反発により多くの分子が行動を阻害され、これは拡散分子のサイズが大きいほど影響を大きく受ける。そして、この効果は分子の拡散速度や反応速度などに大きく影響をおよぼすと考えられる。しかし多くの物理化学的な反応研究では、uncrowded な環境である buffer 中などで実験されることが多い。本研究では糖を高濃度で溶かすことにより擬似的な Crowding 環境を再現し実験を行った。

今回、フォトトロピンの光反応が Crowding 条件下でどのような挙動を示すかを調べた。フォトトロピンはシロイヌナズナなどの植物に含まれる青色光センサータンパク質で、光屈性、葉緑体の光定位運動などを制御している。構造的に LOV ドメイン (LOV1, LOV2) とキナーゼドメインを有しており、光化学反応過程において LOV ドメインがキナーゼの活性制御を担うことが知られている。その反応機構については解明されつつあるが、Crowding 環境下での反応機構については未だ全く分かっていない。我々は、タンパク質分子の拡散係数変化に着目し、過渡回折格子法 (TG 法) を用いることで Crowding 環境下におけるタンパク質全体の反応を評価した。

【実験】タンパク質試料として phot1 LOV2 と phot1 LOV2-linker (図 1)を用い、高濃度の Ficoll (0-300 g/L)を溶かした buffer 中での光反応ダイナミクスを時間分解 TG 法で測定した。

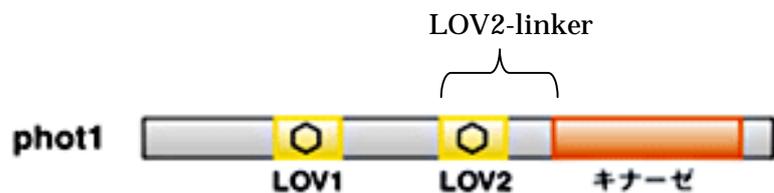


図 1 phot1 の一次構造

【結果と考察】Ficoll 溶液中の phot1 LOV2 を $\lambda=465\text{nm}$ のパルス光で光励起した時の TG シグナルの分子拡散信号を図 2 に示す (a,b は格子波数 q を変えて測定したもので拡散信号の現れる時間スケールが異なる)。図 2 の(a)を見ると Ficoll のない場合には single exponential 型の減衰が観測されたが、Ficoll 濃度を上げていくと立ち上がり減衰からなる biexponential 型の信号が現れ、その強度も増加した。拡散係数の値から Ficoll 0g/L ではモノマーの拡散だけが観測されている一方で、Ficoll 濃度を上げるにより暗状態でダイマーが形成され、その光解離反応が観測されていると解釈した。一方、暗状態でモノマーとして存在している phot1 LOV2 は光励起によって $\sim 30\text{ms}$ でダイマー化反応を起こすことが報告されている。図 2(b)はこの反応が完

了している時間での拡散信号であり、反応物としてのモノマー、生成物としてのダイマーが観測されている。しかしその信号強度は Ficoll 濃度上昇により減少していることから、これも暗状態でダイマー分子が増加し、モノマーのダイマー化反応による信号が減少したためと結論した。以上から Crowding 効果がタンパク質の会合状態に影響を与える(ダイマー化促進)ことが明らかになったが、これは排除体積の効果によるものであると考えている。

一方、phot1 LOV2-linker の TG シグナルを見ると(図 3)、Ficoll のない場合には強い山型の信号が観測されたが、Ficoll 濃度が増加すると、その信号強度が劇的に減少していく様子が観測された。Ficoll 0 g/L で得られる拡散信号は、光照射による linker 部分のヘリックス崩壊に伴って、溶媒との相互作用が強まるため、拡散係数が大きく減少したことに起因するものであることが報告されている。今回観測された Ficoll 濃度上昇に伴う信号強度の低下は、反応分子数の低下かあるいは拡散係数の変化量の減少のどちらかに起因すると思われる。CD 測定をした結果、光照射によるヘリックス含有量の変化は Ficoll 濃度に依存しなかったことから、反応分子数は影響を受けないことがわかった。したがって、Crowding 環境下では壊れたヘリックスと溶媒との相互作用が Ficoll によって阻害され、ヘリックスが壊れる反応の前後での拡散係数の変化量が小さくなったためという可能性が考えられる。また反応量子収率に対する Ficoll の影響も考えられるので、過渡吸収測定で確認した結果も討論会では報告する予定である。

【参考文献】

- [1] R. John Ellis., *TREND in Biochemical Sciences* 26, 10: 597, 2001,
- [2] Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima., *J. Mol. Bio.* 367, 2: 432, 2007,

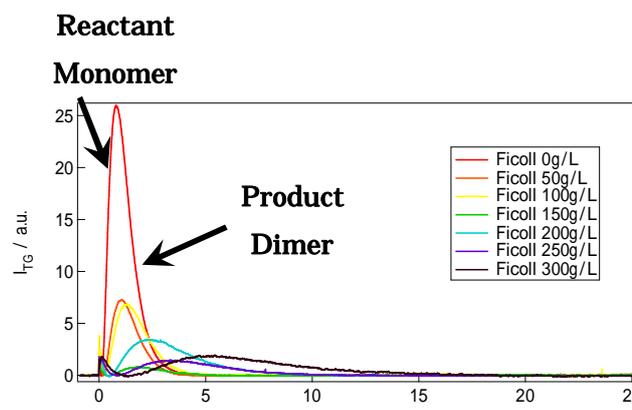
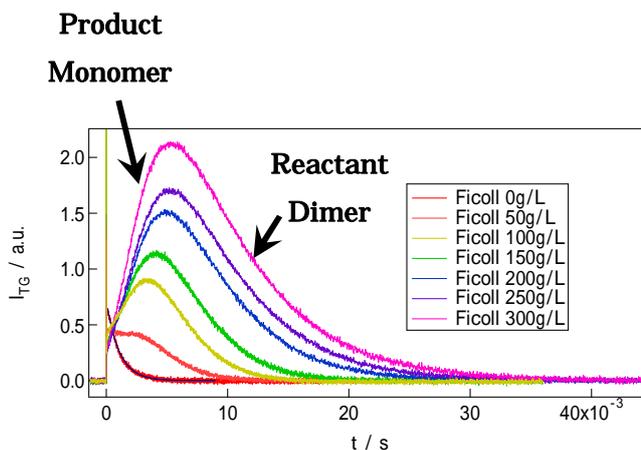


図 2 phot1 LOV2 の TG シグナル。(a) $q^2 = 5.66 \times 10^{12}$, (b) $q^2 = 1.38 \times 10^{11}$

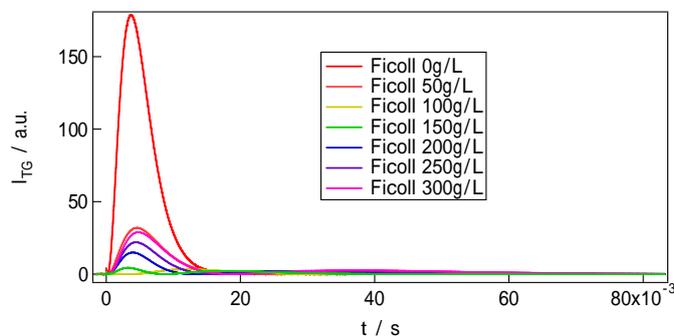


図 3 phot1 LOV2-linker の TG シグナル