

青色光受容蛋白質フォトトロピンの分子論的反応からみた

温度センサーとしての可能性

(京大院理¹、大阪府大院理²、神戸大遺伝子センター³) ○中曾根 祐介¹、永徳 丈¹、直原一徳²、松岡 大介³、徳富 哲²、寺嶋 正秀¹

【序】多くの生命は外界を認識し応答するため、光情報のセンシング機構を持っている。光照射により、センサー蛋白質の構造変化や蛋白質間相互作用の変化が誘起され、機能発現に至るのである。本研究の対象であるフォトトロピンは、植物の様々な運動反応を制御することにより、光合成を増大させる青色光センサー蛋白質である。光受容を担うドメインとして Light-Oxygen-Voltage-sensing (LOV) ドメインを有しており、その光反応が多くに興味を集めてきた。我々は、光反応に伴う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 (TG) 法を適用することで、従来の測定手法では検出が困難な LOV ドメイン間の会合・解離反応や LOV ドメインの C 末端に隣接するヘリックスの崩壊過程を時間分解で検出してきた^{1,2}。本発表では、外的環境の変化に対する蛋白質の挙動を考察するため、フォトトロピンの会合状態や光反応に対する温度の影響を調べたので、その結果を報告する。

【実験】フォトト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 ドメインがキナーゼドメインの活性制御に特に重要であると考えられており、また linker 部分に存在する helix が構造変化を起こすことから、この部位もシグナル伝達に重要であるという見解が広く持たれている。本研究では、これら重要部位の初期状態や光誘起反応に対する温度効果を調べるために、フォトトロピン (シロイヌナズナ由来) の LOV2 ドメイン単体 (LOV2 試料) と、LOV2 ドメインに linker を付随させたもの (LOV2-linker 試料) (図 1) を試料として用い、TG 法による温度変化測定を行った (測定温度: 5 ~ 35 °C)。

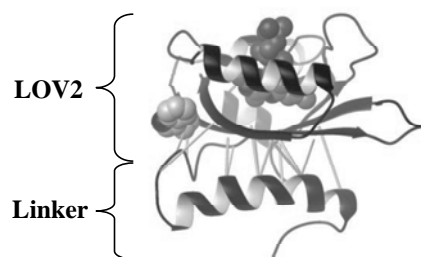


図1 LOV2ドメインとLinker部分の3次構造 (Harper et al. Science. 2003)

【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 (~2 μs) 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 (~100 μs) で観測されている。その後の信号は、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、また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、その形や強度が時間変化することは、観測している時間スケールにおいて拡散係数変化を伴う蛋白質全体の反応が起こっていることを意味している。両方の試料でこの拡散係数変化が観測されたが、その特徴には違いが見られた。詳細な解析の結果、LOV2 試料は暗状態でダイマー・モノマー間の平衡にあり、それぞれ光励起すると解離反応

(モノマー化)、会合反応(ダイマー化)を示すことがわかった。また LOV2-linker 試料では 300 μ s で linker ドメインが LOV2 ドメインから解離する反応が起こり、さらに linker 部分の helix 崩壊という劇的な反応が 1ms で誘起されることを明らかにした。これら一連の反応は吸収変化を伴わない反応であり、過渡吸収測定ではその検出が困難である。

【温度依存的な光反応】 以上に述べた光反応に対する温度効果を調べるために、分子拡散信号を温度を変化させて測定したところ、両方の試料で図3に示すような強い温度依存性が観測された。まず LOV2 試料に関しては、温度低

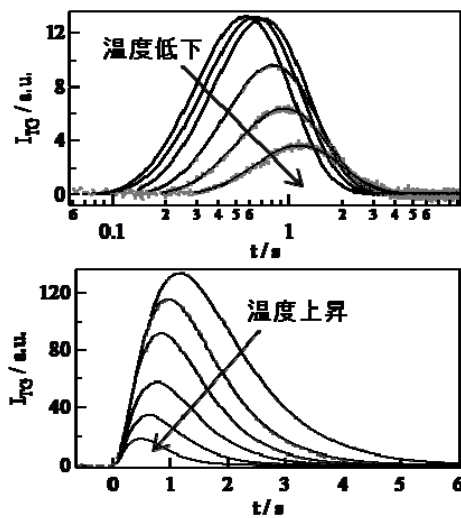


図3 (a) LOV2, (b) LOV2-linkerの分子拡散信号に対する温度依存性

LOV2-linker 試料においても初期状態で既に linker ドメインが解離している分子種が温度上昇に伴い増加しており、この分子を光励起しても拡散係数変化を示さないと結論づけられる。このように LOV2 試料、LOV2-linker 試料ともに初期状態が温度に依存し、さらにその光反応が初期状態に依存することが明らかになった(図4)。これらの結果を基に、フォトロピンが光センサーであると同時に温度センサーとしての機能を有する可能性について議論する。

下に伴い信号強度が減少する様子が観測されたが、これはダイマーの解離反応による信号がモノマーの会合反応による信号を打ち消していることを意味している。つまり温度低下に伴い暗状態でダイマーとして存在する分子数が増えていることに対応しており、この結果よりモノマー・ダイマー間の平衡定数が温度により変化し、ダイマーの方がエンタルピー的に安定 ($\Delta H(M \rightarrow D) = -90$ kJ/mol) であることが明らかになった。一方、LOV2-linker 試料では温度上昇に伴い、信号強度が減少する様子が観測されたが、これは光励起によって拡散係数変化を示す分子数が減少していると解釈され、初期状態に何らかの温度依存性があることが示唆される。LOV2 試料におけるドメイン間相互作用の温度依存性と比較して考察すると、

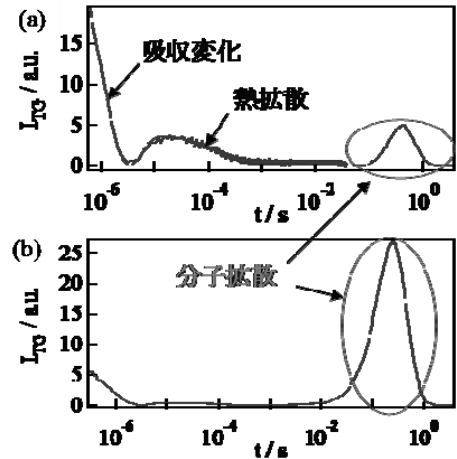


図2 (a) LOV2, (b) LOV2-linkerのTG信号

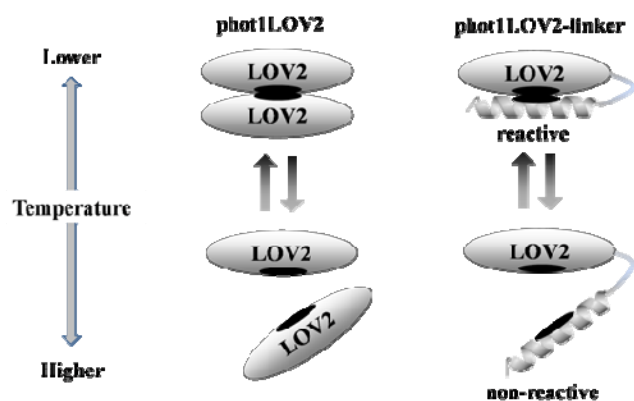


図4 本研究により提唱されるスキーム

1. Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima., *Biophysical Journal*, 91 (2): 645-653, 2006.
2. Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima., *J. Mol. Biol.*, 367 (2): 432-442, 2007.