

## 過渡回折格子法によるバクテリオフィトクロムの

## 構造変化ダイナミクス検出

(京大院理\*, シカゴ大\*\*) ○松岡剛史\*, Emina A. Stojkovic\*\*, Keith Moffat\*\*, 寺嶋正秀\*

【序】植物における光センサーとしては、発芽などに関わる赤色センサーのファイトクロムが良く知られており、多くの研究がなされてきている。しかし、その構造は多くの努力にもかかわらずまだ分かっておらず、更なる研究を困難にしている。ところが、最近、バクテリオフィトクロムと呼ばれる一連の赤色光センサーが細菌に見つかり、これらは植物ファイトクロムと類似の反応をするが、結晶化が比較的簡単で構造が決定されたため、その詳細な反応機構に興味もたれている。ここで扱う *RpBphP2*, *RpBphP3* は、そうしたバクテリオフィトクロムの一種で、紅色光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* が持つ水溶性赤色光センサータンパク質である。*RpBphP2*, *RpBphP3* は、同じ発色団の biliverdin IX $\alpha$  (BV) と同じドメイン構造を持ち、両方のタンパク質で赤外吸収スペクトルにより発色団の構造変化は一般のフィトクロムと似ていることがわかっている。実際に、赤色光の照射によって *RpBphP2* は Pr から Pfr と呼ばれる赤外に吸収を持つ状態へ変化するし、また赤外光の照射で Pfr から Pr へ可逆的に戻ることが知られている(図 1)。この反応は、植物のファイトクロムとほぼ同様である。ところが、*RpBphP3* では、暗状態の吸収スペクトルは *RpBphP2* とほぼ同じであるが、赤色光の照射で主たる吸収バンドの強度が弱くなり、短波長シフトを起こす(図 2)。このように類似の蛋白質にもかかわらず異なった光転換挙動を示すことは興味深い。これらはタンパク質の発色団あるいは発色団付近の情報であり、タンパク質全体の構造変化ダイナミクスについてはほとんど知られていない。本研究では、これらのタンパク質の情報伝達機構に関する知見を得るため構造変化ダイナミクスを過渡回折格子法 (TG 法) により調べた。

【実験】二本の励起光で作った干渉縞によって分子を光励起し、ここにプローブ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。励起には YAG 励起の色素レーザー (710 nm) を用い、プローブ光には赤外ダイオードレーザー (840 nm) を用いた。紅色光合成細菌の持つ *RpBphP2* と *RpBphP3* を生成・精製後、バッファー (20mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 8.0) に溶かしてサンプルとして用いた。

【結果と考察】実験に用いたサンプルの吸収スペクトルをそれぞれ示す (図 1, 図 2)。*RpBphP2* では従来のフィトクロムと同様に Pr 状態に赤色光を当てるとレッドシフトしているが、*RpBphP3* ではブルーシフトしていることが確認された。

図 3, 図 4 には、*RpBphP2*, *RpBphP3* を光励起した後に見られた TG 信号をそれぞれ示す。*RpBphP2* では放出された熱拡散の信号の後、約 10 マイクロ秒で立ち上がりが見え、その後約 10 ミリ秒で大きな立ち上がりで減衰の信号が見られた。格子波数  $q$  依存性が約 10 ミリ秒の信号でのみ見られたことから、この信号は光励起による親分子と生成物の分子拡散を表している。また、別の  $q$  値での TG 信号から、過渡吸収で見られている約 10 ミリ秒の成分も確認された。これらの TG 信号の結果と過渡吸収の結果から、光励起後約 10 マイクロ秒で中間体 I になった後、約 10

ミリ秒で Pfr 状態に至ると考えることができる。特に興味深いのは、その反応の中の Pfr 状態への変化において拡散係数が  $1.0 \times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  から  $4.0 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  と小さくなるような構造の変化が起こることがわかったことである。さらに、この拡散係数変化がミリ秒から 100 ミリ秒の時間領域で観測された。

一方、RpBphP3 では熱拡散の後、図 4 に示すような小さな信号が観測された。過渡吸収で見られた約 10 ミリ秒の成分と約 200 ミリ秒の成分があり、その後に数秒での減衰が見られる。格子波数  $q$  依存性が数秒の減衰の成分で見られたことから、この信号がタンパク質分子の拡散を表していることがわかる。これと過渡吸収の結果から、ミリ秒より速い時間で中間体 I<sub>1</sub> になり、約 10 ミリ秒で中間体 I<sub>2</sub> になった後、約 200 ミリ秒で Pnr 状態に至るというスキームが考えられる。約 200 ミリ秒の成分は過渡吸収では見られなかったため、発色団付近の変化を伴わない構造変化であろう。また、数秒で観測された減衰信号が一つの指数関数で表されることは、この蛋白質の反応では、拡散係数を大きく変化させるような構造変化は起こっていないことを示している。信号の解析により、拡散係数は  $1.9 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  と求められた。

この測定で特に興味深いことは、RpBphP2 では大きな拡散係数変化がみられたが、RpBphP3 では拡散係数変化が見られなかったことである。この拡散係数変化の程度の差は構造変化の大きさの程度の差を表していると考えている。現在、特に RpBphP2 について、より詳しい構造変化ダイナミクスを調べており、講演会で発表予定である。

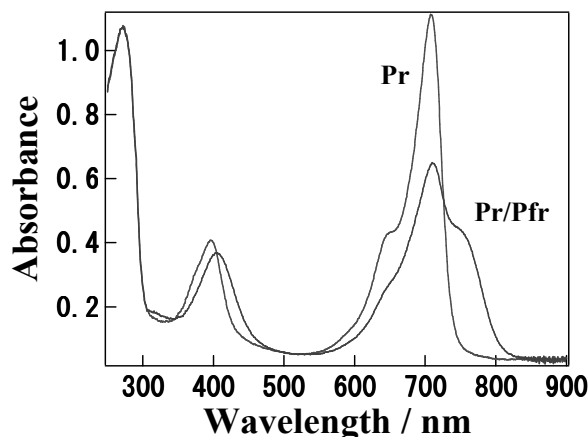


図 1. RpBphP2 の吸収スペクトル

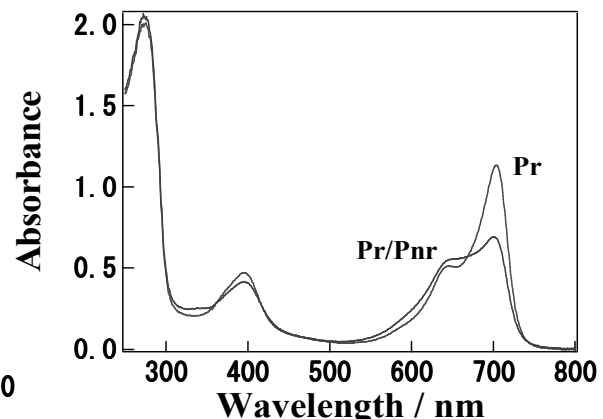


図 2. RpBphP3 の吸収スペクトル

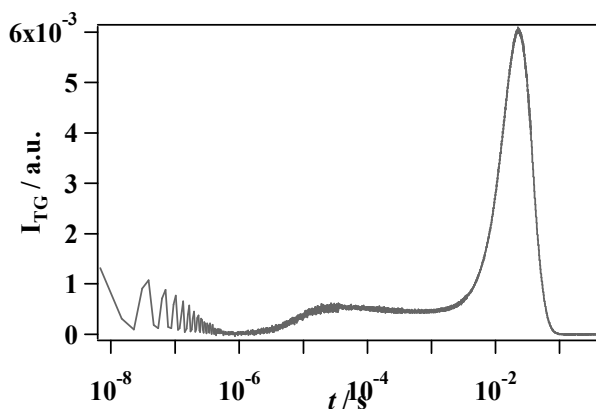


図 3. RpBphP2 の TG 信号 ( $q^2=1.17 \times 10^{12} \text{m}^{-2}$ )

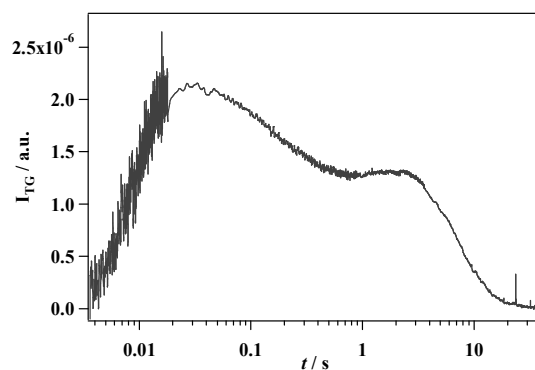


図 4. RpBphP3 の TG 信号 ( $q^2=5.6 \times 10^9 \text{m}^{-2}$ )