

## 2B21

### 光センサータンパク質フォトトロピンの光反応と隠された機能

(京大院理<sup>1</sup>・府立大理<sup>2</sup>) 中曽根祐介<sup>1</sup>、直原一徳<sup>2</sup>、松岡大介<sup>2</sup>、徳富哲<sup>2</sup>、鈴木友美<sup>1</sup>、長谷あきら<sup>1</sup>、○寺嶋正秀<sup>1</sup>

【序】多くの生命は外界を認識し応答するため、多くのセンサーを持っている。通常は、すでに機能の知られた生体タンパク質の物理化学的測定を行い、反応機構を明らかにする分子科学的研究がおこなわれる。例えば、我々はフォトトロピンと呼ばれる植物の持つ青色光センサータンパク質の反応機構に興味をもち、研究を進めてきた。このタンパク質は、光屈性・葉緑体の光低位運動・気孔の開閉運動を制御するタンパク質であり、光検出を担うドメインとして Light-Oxygen-Voltage-sensing (LOV) ドメインを有している。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<sup>1,2</sup>。ところが、我々はその研究過程で、非常に大きな反応の温度依存性を見出した。この反応の温度依存性の意味を考えると、生体内でも、こうした温度依存的な機能を持っているのではないかと推察され、このことはフォトトロピンが温度センサーとしても働いているのではないかという推測を導く。もしこれが実証されれば、分子科学的研究から逆にこれまで知られていなかった機能を明らかにできることになり、非常に興味深い。これまで調べてきた反応機能の温度依存性と対応させて、実際に植物でそうした温度センサーとしての機能をはたしているのかどうかについて調べた。

【実験】フォトトロピン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 部分に存在するヘリックス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。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 ドメインに linker を付随させたもの (LOV2-linker 試料) を試料として用い、TG 法による温度変化測定を行った。また、生理機能の研究においては、シロイヌナズナの野生株 (WT) とフォトトロピンを欠損させた変異株 ( $\Delta$ MT) を用意し、寒天培地で 2 週間育てたあと、土に植えついでさらに 2 週間育てたものを測定に用いた。特に、フォトトロピンが制御していることが確立している、気孔の開閉運動、葉緑体の光定位運動への温度効果を調べた。

【結果と考察】LOV2-linker 試料では 300  $\mu$ s で linker が LOV2 ドメインから解離する光反応が起こり、さらに linker 部分のヘリックス崩壊という劇的な反応が 1ms で誘起されることを、主に過渡回折格子 (TG) 法を用いて明らかにした。この光反

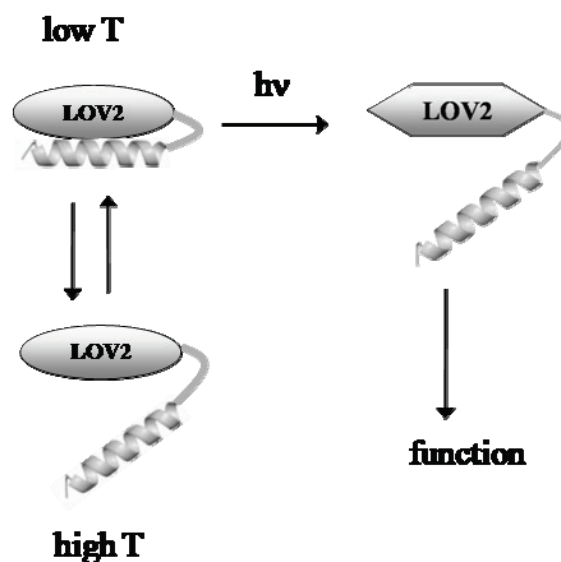


図1 TG 信号の温度依存性から決められた初期状態の平衡。低温構造のみが機能に結び付く光反応を起こす。

応に対する温度効果を調べるために、TG 信号の温度依存性を測定したところ、温度上昇に伴い、分子拡散を示す信号強度が減少する様子が観測された。これは光励起によって構造変化を示す分子数が減少していると解釈され、初期状態に温度依存性があることが示唆される。我々はこの結果を、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した。すなわち、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といえる (図1)。

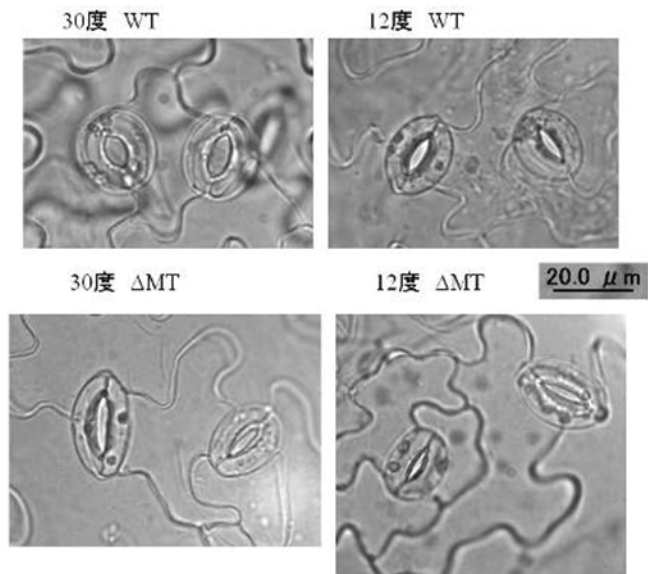


図2 WT と $\Delta$ MT シロイヌナズナの低温と高温での気孔の顕微鏡像

これらの結果を基に、フォトトロピンが温度センサーとしての機能を有する可能性について調べるため、制御している機能の一つである、気孔の開閉運動への温度効果を検討した。図2に透過型顕微鏡で捉えた気孔の写真を示す。WT、 $\Delta$ MT とも気孔の大きさ自体には差がなかった。開口度を種々の温度に対して測定したところ、 $\Delta$ MT では開口度が目立った温度効果が見られなかった。ところが WT では温度上昇に伴い気孔の開口度が上昇する様子が観測された (図3)。以上の結果は、植物が温度を感知して気孔の開閉を行い、そのためにフォトトロピンが重要であることを意味している。分子レベルでの反応機構から考えると、温度上昇により linker 部分が解離した分子種が増加し kinase の活性化が促進され、気孔の開口という形で現れたと解釈できる。

同様に、葉緑体の定位運動への温度依存性も調べた。 $\Delta$ MT については温度を変えても光を照射しても葉緑体の定位運動が誘起されないが、WT では、光に対するレスポンスが、温度依存的事業が見出された。この結果からフォトトロピンが制御する現象の一つである葉緑体運動に対しても温度効果があることがわかった。

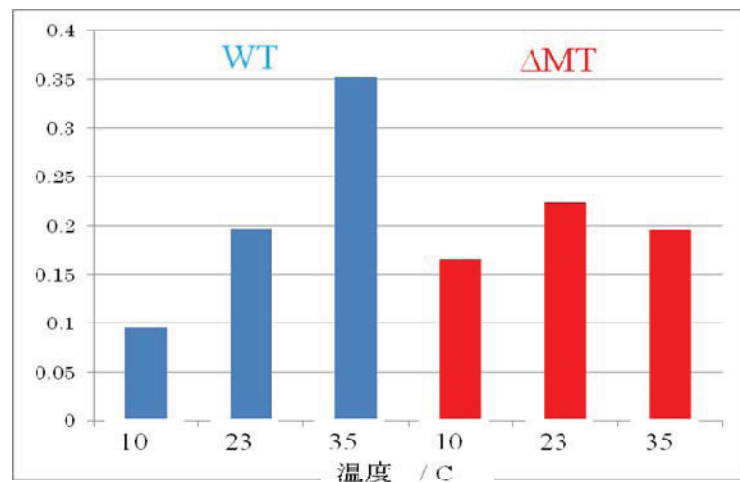


図3 WT と $\Delta$ MT シロイヌナズナの気孔の開口度の温度依存性

#### 参考文献

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.