

## 2P099

### バクテリオフィトクロムの構造変化ダイナミクスの研究

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

【序】生物は外的環境に応じて行動するために、種々の光センサーを持っている。例えば、植物の発芽などに関わる赤色センサーのフィトクロムが良く知られ、盛んに研究がおこなわれてきた。最近、バクテリオフィトクロムと呼ばれるフィトクロムと一次構造が良く似たタンパク質が細菌にも見つかり、その反応機構に興味をもたれている。ここではそうしたバクテリオフィトクロムの一種の *RpBphP2* という、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の光反応を調べた。*RpBphP2* は同様のバクテリオフィトクロムの一種 *RpBphP3* と協同で働き機能を発現することがわかっており、これらは同じ発色団の 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植物のフィトクロムと似ていることがわかっていて、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し、また赤外光の照射で Pfr から Pr へ可逆的に戻る。この反応は、植物のフィ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。このようにドメイン構造などが類似のタンパク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。そのため、我々はこれらのタンパク質の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、昨年報告した。その結果、*RpBphP2* では大きな拡散係数変化を示す TG 信号が見られたが、*RpBphP3* では見られなかった。このことより、*RpBphP2* が光情報伝達過程において重要な役割を果たしていると考えている。本研究では、*RpBphP2* の反応についてさらに詳細に調べるために、長さの違うサンプルで TG 信号を測定し、その構造変化について調べた。

【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) を使い、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*

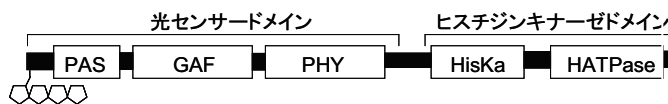


図 1. *RpBphP2* の一次構造

の長さの違うタンパク質 (図 1、光センサードメイン、全長及び PAS-GAF ドメイン) をそれぞれ生成・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】 *RpBphP2* の光センサードメインを光励起した後に見られた TG 信号を図 2 に示す。放出された熱による熱グレーティング信号の後、数百マイクロ秒で減衰が見られ、その後数十ミリ秒において大きな立ち上がりと減衰の信号が見られた。この山型の信号の格子波数  $q$  依存性から、この信号は親分子と生成物の分子拡散を表しており、光反応によって拡散係数が変化したことを示している。この信号を解析して、反応物と生成物の拡散係数の値を決めると、反応物の拡散係数が  $1.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  であるのに対して、生成物の拡散係数は  $5.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  と大きく減少していることがわかった。また、拡散信号の強度が  $q$  の値に依存して変化したが、これは観測した時間領域において拡散係数変化反応が起きていることを示している。その速度定数を求めると、約 30 ms の時間スケールであった。

*RpBphP2* 全長でも同様の測定をしたところ、その TG 信号は、光センサードメインの TG 信号と同様に、熱グレーティング信号の後、数百マイクロ秒での減衰と数十ミリ秒での大きな立ち上がりと減衰の信号が見られた (図 3)。この山型の信号において  $q$  依存性が確認されたので、これは拡散係数変化を示す信号である。同様に解析を行い、反応物の拡散係数が  $9.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  であり、生成物の拡散係数が  $3.1 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  であることがわかった。また、反応の時定数は約 40 ミリ秒と決定された。

このように、拡散係数の時間変化速度は、光センサードメインだけでも、全長でもほぼ同じであることが分かった。このことは、拡散係数変化を示すような構造変化は、センサードメインによって引き起こされていることを示している。一方で、拡散係数の変化は全長のほうが光センサードメインのものよりやや大きかった。このことは、構造変化はセンサードメインだけでなく、ヒスチジンキナーゼドメインでも起こっていることを示している。構造変化において重要な役割を果たしていると考えられている PHY ドメインの有無による信号の違いは現在調べており、この内容も含めて講演会で発表予定である。

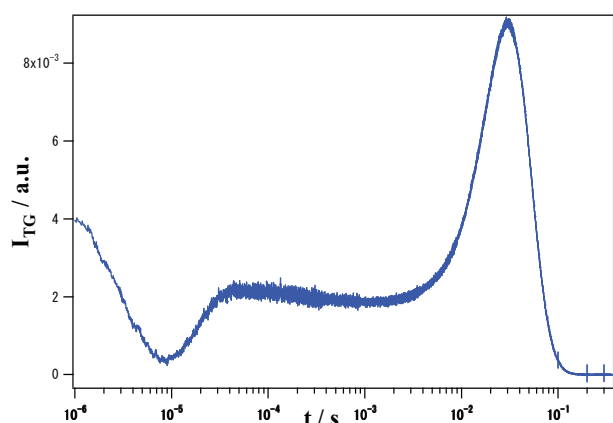


図 2. *RpBphP2* の光センサードメインの光励起後の TG 信号  
( $q^2=8.032 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$ )

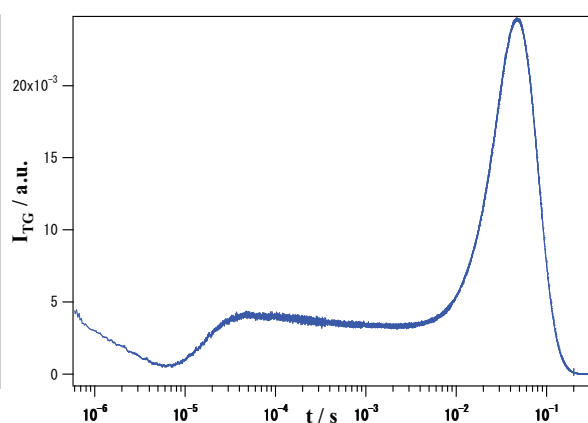


図 3. *RpBphP2* の全長の光励起後の TG 信号  
( $q^2=8.032 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$ )