

## 光センサータンパク質 Phot2LOV1 の光反応の解明

(京大院理<sup>1</sup>、九大院理<sup>2</sup>) 川口 雄輝<sup>1</sup>、 孔 三根<sup>2</sup>、 和田 正三<sup>2</sup>、 寺嶋 正秀<sup>1</sup>

【序】ほとんどの生物は、外的環境に応じて行動するために、様々な光センシング機能を有するタンパク質を持っている。光照射によって、光センサータンパク質の構造変化や相互作用変化が誘起され、その情報が下流の分子に伝わり、機能を発現するに至る。そうした光センサータンパク質の一つであるフォトトロピンはシロイヌナズナなどに含まれている青色光センサーであり、光屈性や気孔の開閉、葉緑体の光定位運動等を制御している。光受容を担うドメインとして、Light-Oxygen-Voltage-sensing(LOV)ドメインを2つ有しており、その光反応がこれまで広く興味を持たれてきた。このうちの一方である LOV1 ドメインは Phototropin の二量体化サイトとしての機能を持つと考えられている。また最近、機能解析の結果から、LOV1 のC末端側に存在するヒンジと呼ばれる領域が生理的な機能に重要であることが示唆された。そこで、本研究では過渡回折格子法 (TG 法) を用いて、ヒンジ付きの LOV1 とヒンジなしの LOV1 (図1) の光反応を明らかにし、それらを比較することで、ヒンジ領域の果たす役割について考察する。

【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射することで得られる回折光(TG 光)の強度の時間変化を光電子増倍管で検出した。励起光には excimer 励起に色素レーザー(465nm)を用い、プローブ光には赤外ダイオードレーザー(840nm)を用いた。タンパク質試料として phot2 LOV1(116-242)と phot2 LOV1+hinge(116-276)をバッファーに溶かしたものを用いた。

【結果と考察】パルス光で光励起した後の phot2 LOV1 と phot2 LOV1+hinge の TG 信号を図 2 に示す。それぞれの試料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と、励起分子から放出された熱の拡散信号が、比較的

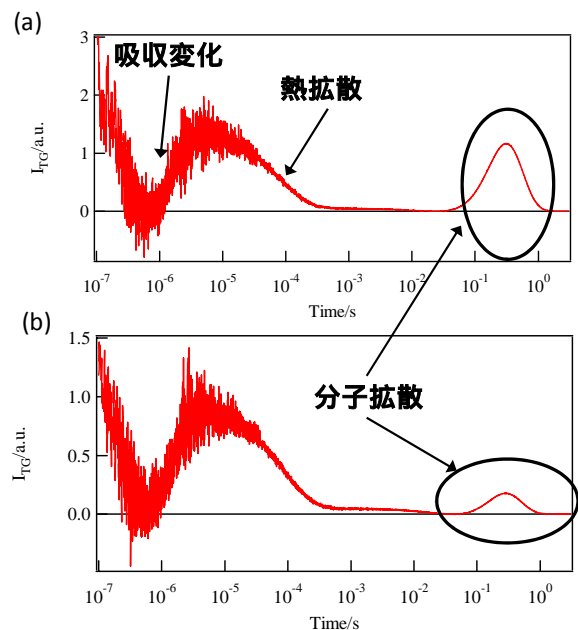
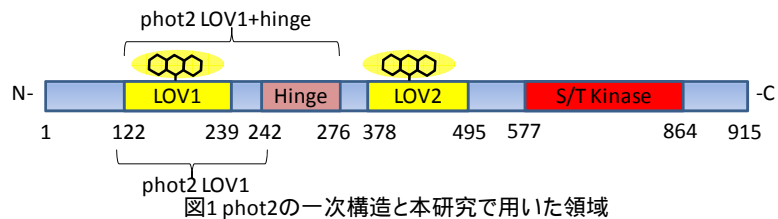


図2(a)phot2 LOV1+hinge(b)phot2 LOV1のTG信号

早い時間スケールで観測されている。その後の信号は、タンパク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た。これらの信号より、両方の試料で拡散係数が減少するような反応が起こっていることが分かる。また興味深いことに、格子波数を変化させて測定したところ、この拡散信号の形や強度が観測時間に依存していることが明らかになった。この分子拡散信号の強度や形が時間変化することは、拡散係数変化を伴う反応がこの時間スケールにおいて起こっていることを意味している。その拡散係数が変化する速度にそれぞれの試料で違いがあることが分かり、phot2 LOV1+hingeの方が遅いことが分かった。

次に、この拡散係数変化が会合反応によるものか、構造変化によるものかを決めるために、TG 信号の濃度依存性を測定した。構造変化によって拡散係数が変化する場合、反応速度が濃度に依存しないため、TG 信号は濃度に依存しない。会合反応によって拡散係数が変化する場合、反応速度が濃度に比例するため、濃度を濃くすると TG 信号の強度が大きくなることが予想された。しかし、実際に得られた信号は濃度を濃くすると拡散信号の強度が小さくなるという予想に反した結果が得られた(図 3)。この濃度依存性を、反応物に単量体と多量体の平衡があり、濃度を濃くすることによって、平衡が信号に寄与していない方の分子に偏り、信号が小さくなったと解釈した。この解釈を検討するため、早い時間スケールにおいて同様に濃度依存性の実験を行ったところ、どちらの試料においても、遅い時間で観測したときよりも濃度変化割合が小さくなることが見られた(図 4)。

この結果は、上で述べた単量体と多量体の平衡とともに、会合反応による拡散係数変化が存在しているとして解釈できる。phot2 LOV1 と phot2 LOV1+hinge において、TG 信号自体や、濃度変化による信号強度の変化率などに違いが見られたが、この違いが何に起因するののかは、動的光散乱法(DLS)等、他の実験を併用しながら現在調べており、この内容も含めて講演会で発表予定である。

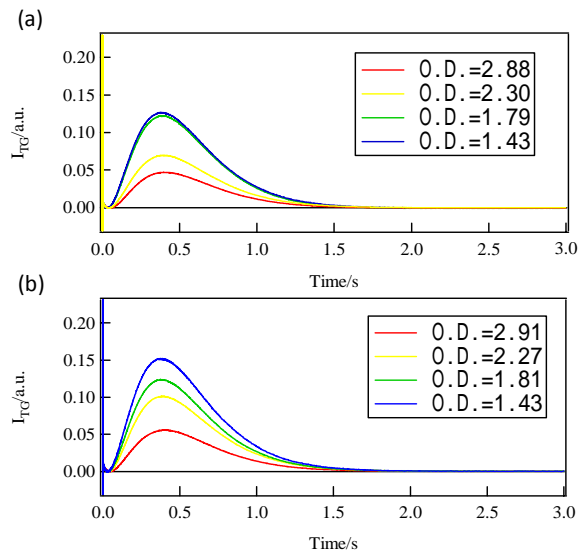


図3(a)phot2 LOV1+hinge(b)phot2 LOV1のlowqでの濃度依存性

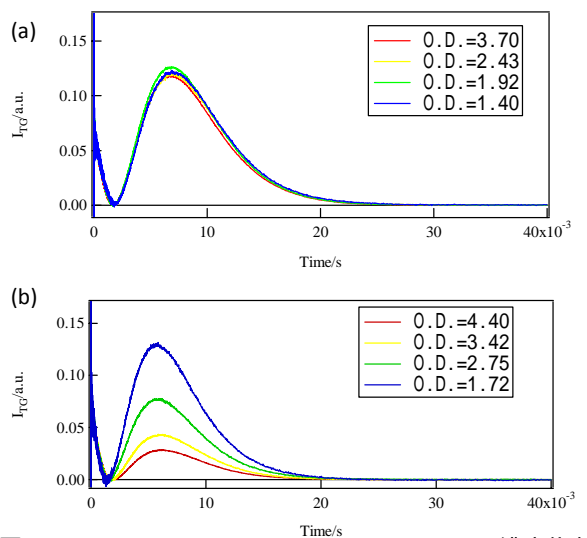


図4(a)phot2 LOV1+hinge(b)phot2 LOV1のhighqでの濃度依存性