

オーレオクロムの光反応ダイナミクスの解明

(京大院理*, 阪大院理**) ○豊岡継泰*, 久富修**, 寺嶋正秀*

【序】近年、フシナシミドロ中でオーレオクロムという新規の青色光受容タンパク質が発見された。¹⁾ オーレオクロムには、オーレオ1とオーレオ2の2種類があり、オーレオ1は主に枝の成長点である突起の発生を担い、オーレオ2は枝の成長の源となる生殖器官の形成を制御していることが報告されている。このタンパク質はC末端側に青色光センサーとして働く Light-Oxygen-Voltage-sensing (LOV)ドメインをもち、中央部には転写因子として働くことで知られる basic region-leucine zipper (bZIP)ドメインをもっている。オーレオクロムは暗状態でダイマーを形成しており、青色光を受光すると各々の bZIP ドメインで DNA を挟み込むかたちで結びつくといわれており、それが機能発現に重要であると考えられているが、その反応についてはほとんどわかっていない。ここでは、サンプルとしてオーレオ1のN末端側を100残基ほど切った AC1-ZC (図1) を用いて、過渡回折格子(TG)法により反応ダイナミクスを調べた。AC1-ZCはLOVドメインとbZIPドメインを保持しており、機能発現までの光反応は全長と同様に起こることが示されている。更に、DNAを加えた場合の変化より、DNAとの相互作用変化の検出も試みた。

【実験】TG測定では、オーレオ1
光反応を開始させる励起光として波長465

nmの色素レーザーを用い、プローブ光として波長840nmのダイオードレーザーを用いた。また、測定はすべて Tris-HCl バッファー (20mM Tris-HCl (pH7), 400mM NaCl, 1mM DTT) 中で行った。

【結果と考察】AC1-ZCを光励起後に見られるTG信号を図2に示す。~2 μ sの時間スケールにLOVドメインにあるシステイン残基と発色団であるFMNとの共有結合形成の信号と、~10 μ sに励起分子から放出された熱の拡散が観測された。また、さらに遅い時間スケールに、立ち上がりと減衰を示す山型の信号が観測された。これは、格子波数の

変化に伴って速度を変えたことから、拡散信号であると同定され、立ち上がり成分が反応分子の拡散、減衰成分が生成分子の拡散を表すことがわかった。更に、種々の格子波数での信号を統一的に解析したところ、この反応は $k^1 = 160\text{ms}$ で起こり、拡散係数は $7.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ から $3.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ に変化していることがわかった。反応分子の拡散係数より、このAC1-ZC

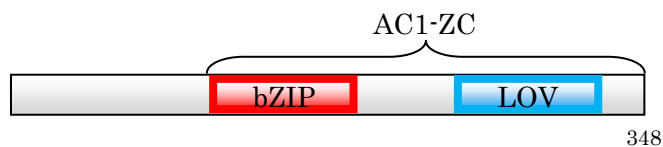


図1 AUREO1の一次構造

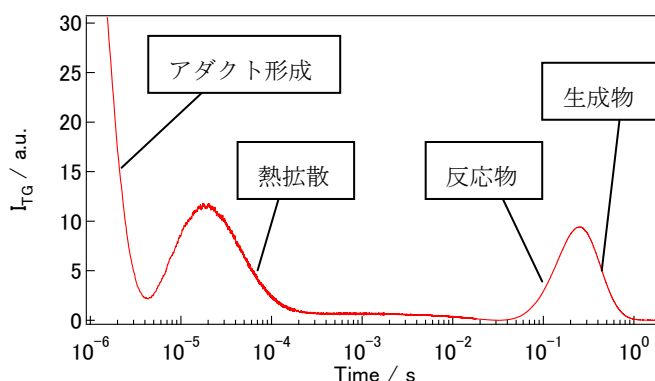


図2 AC1-ZCのTG信号 ($q^2 = 3.8 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)

がダイマーであると考えられる。

この拡散係数変化を伴う反応がどのような反応かを知るために、拡散信号の AC1-ZC 濃度依存性を調べた。もし拡散係数が、分子会合によって起こっているのならば、濃度によって速度が変わり、信号が変化するはずである。図 3 が AC1-ZC の濃度を 250 μM から 125 μM まで変えた時の拡散信号 (信号強度で規格化) であるが、AC1-ZC の濃度を変えても拡散信号に顕著な変化は見られなかった。よって、この反応は会合反応ではなく構造変化を伴う反応であることがわかった。また、光誘起により bZIP ドメインと DNA が結合することから、この構造変化は bZIP ドメインの構造変化であると考察した。(図 4)

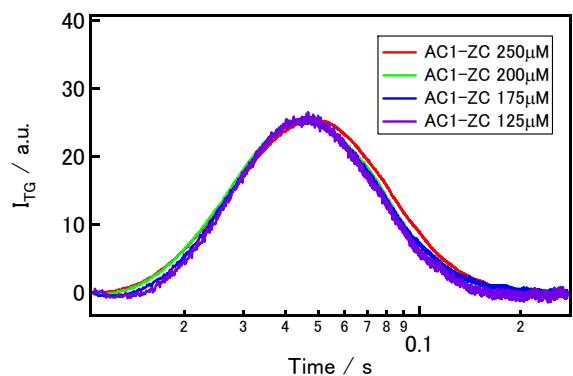


図 3 AC1-ZC の拡散信号の濃度依存性 ($q^2 = 7.11 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)

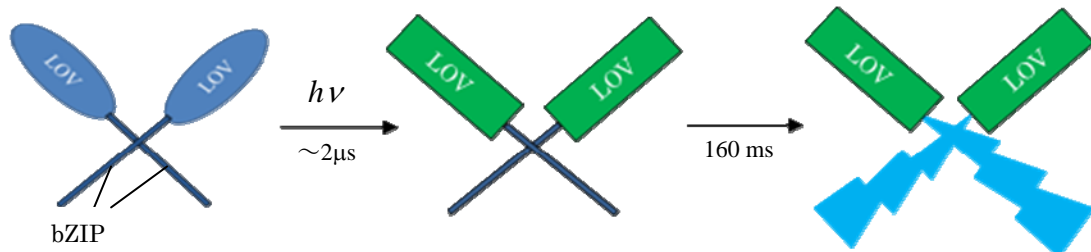


図 4 本研究により提唱される AC1-ZC の反応スキーム

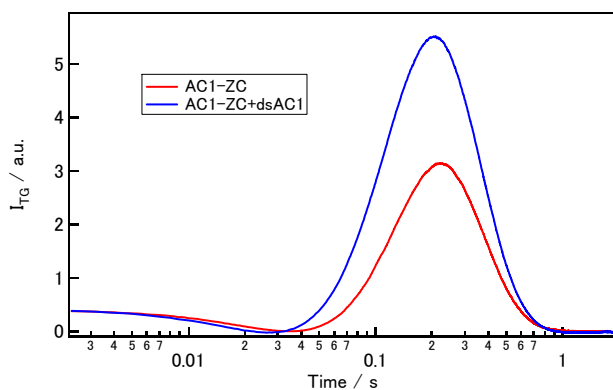


図 5 AC1-ZC と AC1-ZC + DNA(?) の拡散信号 ($q^2 = 1.23 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)

べる予定である。

【参考文献】

- 1) F. Takahashi, D. Yamagata, M. Ishikawa, Y. Fukumatsu, Y. Ogura, M. Kasahara, T. Kiyosue, M. Kikuyama, M. Wada and H. Kataoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **104**, 49 (2007)

さらに AC1-ZC と強く結合すると報告されている TGACGT の塩基配列をもった DNA を加えて TG 信号を測定した。(図 5) すると AC1-ZC とは信号の強度も時間スケールも異なる新たな信号が観測された。これは AC1-ZC とその DNA との相互作用変化を表す信号であると考察できるが、その詳細については検討中である。今後はゲル濾過や動的光散乱など TG 法以外の手法での測定も用いて、AC1-ZC と DNA との相互作用ダイナミクスを調