

## 青色光センサータンパク質 PixD の光誘起反応ダイナミクス

(京大院理<sup>1</sup>、東大院総合文化<sup>2</sup>、阪府大院理<sup>3</sup>)○田中啓介<sup>1</sup>、岡島公司<sup>2,3</sup>、池内昌彦<sup>2</sup>、徳富哲<sup>3</sup>、寺嶋正秀<sup>1</sup>

【序】PixDはシアノバクテリアの走光性の調節に関わる青色光センサータンパク質である。青色光の受容のために、発色団としてフラビンを結合するBLUF (sensors of Blue Light Using FAD)ドメインを持ち、その構造や光反応機構が近年多くの興味を集めている。

PixDは図1に示すように、環状の五量体が2つ重なって十量体を形成することが結晶解析により明らかにされている<sup>1</sup>。暗状態ではこの十量体をもとにして、レスポンスレギュレータであるPixEと、PixD:PixE = 10:5の複合体を形成し、青色光照射によりPixDの二量体とPixEの単量体に解離する<sup>2</sup>。この解離反応、すなわち光誘起のタンパク質間相互作用変化が生体内での情報伝達において重要な役割を果たすと考えられている。

PixDの光誘起の構造変化がこのタンパク質間相互作用を変化させると考えられるが、青色光照射後サブナノ秒で吸収スペクトルがわずかにレッドシフトした中間体が生成するということが報告されているのみであり<sup>3</sup>、タンパク質全体の構造変化についてはほとんど明らかにされていない。ここでは、PixDの光反応に伴う構造変化や会合状態の変化を明らかにするために、光励起後の体積変化や拡散係数変化を高い時間分解能で観測できる過渡回折格子法(TG法)を用いて光反応ダイナミクスを調べた。また、吸収スペクトル変化は示すが、機能は発現させない変異体(M93A)についても同様の測定を行い、局所的な構造変化や光情報伝達機構について考察した。

【実験】シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803のPixD (Slr1694)を組換え大腸菌を用いて発現・精製し、測定に用いた。TG測定では、波長460 nmの色素レーザーを励起パルス光、840 nmのダイオードレーザーをプローブ光とした。

【結果・考察】図2にPixDを弱い青色光で励起した後観測されるTG信号を示す。早い時間領域の減衰は励起分子から放出された熱の拡散による信号である。数十ミリ秒に観測された山形の信号は様々な条件での測定の結果、立ち上がりは体積膨張、減衰が一成分の分子拡散であることが分かった。また、体積変化の時定数は50 ms、拡散係数は $4.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と決定された。この拡散係数の値はPixDの十量体の分子量に対応するものであった。

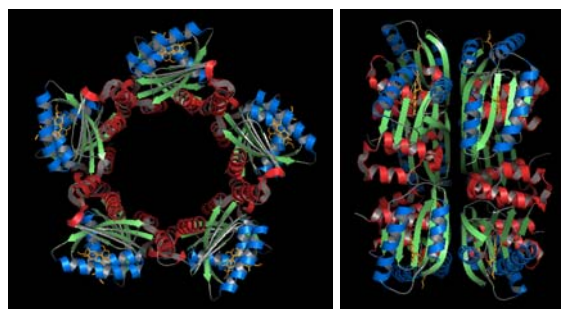


図1. PixDの結晶構造:  
(左) 正面図、(右) 側面図。

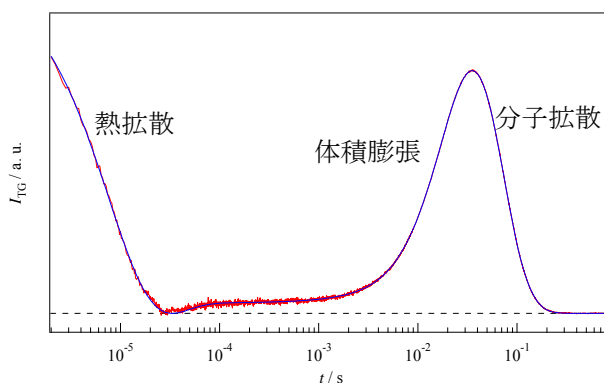


図2. PixDのTG信号。

興味深いことに、励起光強度を高くして測定を行うと新たな反応成分が観測された(図3)。一番遅い減衰が反応物、立ち上がりが光反応生成物の拡散に帰属できた。それぞれの拡散係数は、 $4.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ および $6.0 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であり、この拡散係数変化の速度はおおむね150 msと見積もられた。生成物の拡散係数はPixD二量体の分子量に対応しており、強い光で励起すると十量体から二量体へ解離反応が起こることが示唆された。

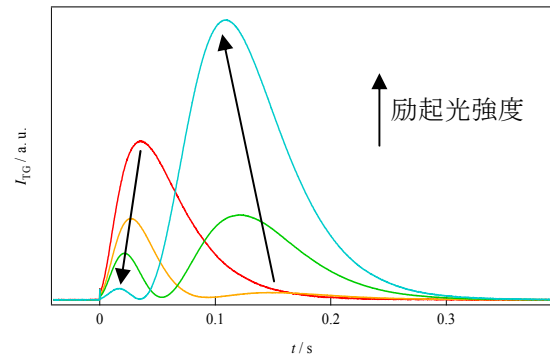


図 3. TG 信号の励起光強度依存性.

このことを確かめるために、ゲルクロマトグラフィー測定を行った。暗状態では主に十量体のピークが観測されたが、光照射下では完全に消滅し、全てが二量体のピークとして観測された。

光反応機構の分子論的詳細についての知見を得るため、M93A変異体を測定した結果を図4に示す。この結果から分かることは、WTで観測された体積変化を示す信号が観測されないことと、反応物が十量体を形成しないということである。Met93残基は十量体中の二量体同士が接触する領域( $\beta$ シート)に存在し、この部分の構造変化はFTIRや蛍光測定などから既に報告されている<sup>4</sup>。従ってTG測定で観測された体積膨張は二量体間の接触領域にある $\beta$ シートの構造変化に帰属できた。またこの結果は、Met残基により十量体が安定化されることを示しており、PixEとの相互作用においてもPixDの十量体形成が主に寄与していると考えられる。

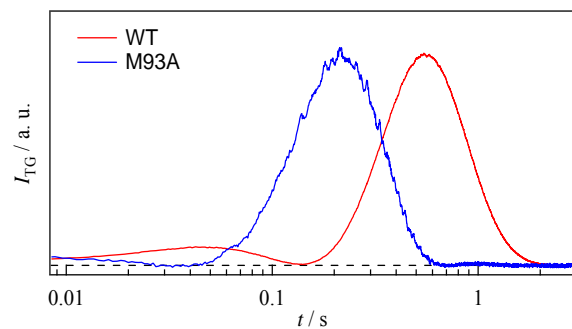


図 4. M93A 変異体の TG 信号.

以上よりPixDの光情報伝達過程においては、Met93を中心とした構造変化が起こり、これにより十量体中の二量体間の相互作用が減少して十量体の解離反応が誘起されるという反応機構が提唱される。またこれらの構造変化と解離反応はそれぞれ、体積膨張と拡散係数変化として時間分解で観測でき、時定数を50 msと150 msと決定できた(図5)。

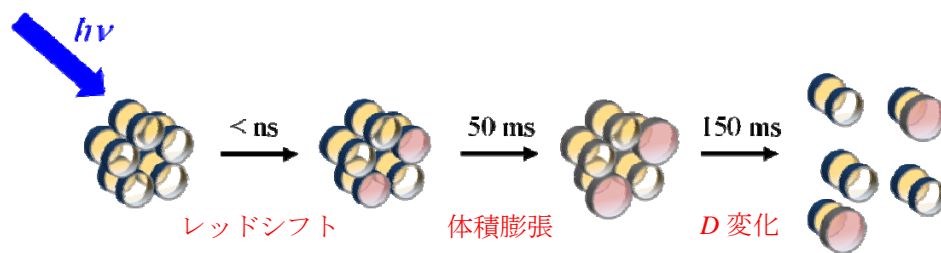


図 5. PixD の光誘起反応ダイナミクス.

#### 参考文献

1. *Biochemistry*. (2006), 45, 12687-12694.
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2008), 105, 11715-11719.
3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2006), 103, 10895-10900.
4. *Plant. Cell. Physiol.* (2008), 49, 1600-1606.