

時間分解拡散検出による青色センサータンパク質 PixD の

タンパク質間相互作用ダイナミクス

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

【序】タンパク質の化学反応からその機能のメカニズムに迫るためには、一つのタンパク質の化学反応だけでなく、タンパク質間相互作用のダイナミクス検出が必要となる。ここでは、拡散係数の時間分解測定によって、タンパク質間相互作用ダイナミクスを捉えた研究について報告する。このために、PixDと呼ばれる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を用いた。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。¹PixD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、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。これまで我々のグループでは、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てきた。また、生化学的研究によって、暗状態では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ことが報告されている。²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提案されている。ここでは、PixDの反応について述べ、次いでタンパク質間相互作用のダイナミクス検出のためにレスポンスレギュレータであるPixEを加えた系での反応を調べた。

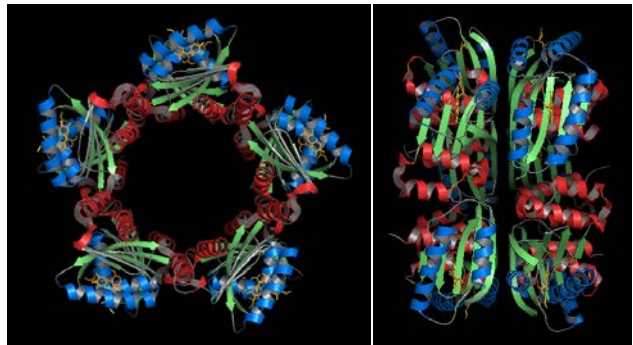


図1. PixDの結晶構造: (左) 正面図、(右) 側面図。

【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】

まず、PixEのない場合のPixDの反応についてまとめる。図2にPixDを弱い青色光で励起した後に観測されるTG信号を示す。弱い光強度での励起の時、数十ミリ秒に観測された山形の信号は様々な

条件での測定により、立ち上がりが体積膨張速度、減衰が一成分の分子拡散過程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。すなわち、光反応によって、構造変化は起こっても、この分子の拡散係数に変化はない(すなわち、親水性部分の露出といった大きな構造変化や解離反応などは起こっていない)ことを示している。また、ここで決定された拡散係数の値は、10量体を示しており、PixEが存在しない状態でも10量体になっていることが分かった。これはゲル濾過によっても確認された。さらに、励起のための光強度を増加させていくと、図2に示すように、信号の形が劇的に変化することが見出された。信号型の解析から、立ち上がりが生成物の拡散、減衰が反応物の拡散であることが分かった。また、決定されたそれぞれの拡散係数の値は、反応物がPixDの10量体、生成物がPixD二量体として妥当な値であった。このことは、10量体のうち複数個が励起されるとはじめて解離反応が起こることを意味する。すなわち、解離するのはPixEの存在のためではなく、PixD自体の性質であることを示している。また、M93A変異体では、WTで観測された体積変化や拡散係数変化が観測されなかったことか

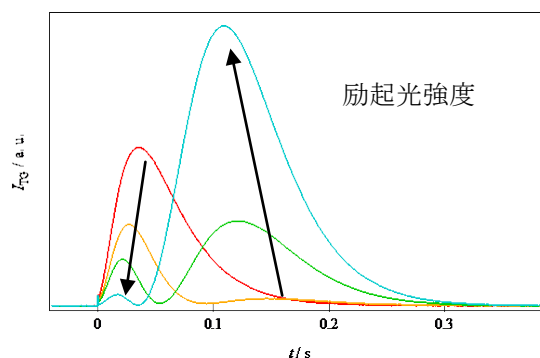


図 2. TG 信号の励起光強度依存性.

ら、解離に重要な変化はMet93残基およびこれを含むループ領域の構造変化、あるいはその領域での揺らぎ増大で起こっていることが示された。

次に、情報の伝わるはずのPixEが存在するとどのように反応が変わるのか、またどのような速度で情報が伝わるのかを調べた。図3にPixD-PixE複合体を青色光で励起した後に観測される分子拡散信号の観測時間依存性を示す。立ち上がり・減衰成分からなる分子拡散信号が観測されたことは、光反応に伴う拡散係数の変化が起こっていることを表している。信号型の解析から、立ち上がりが生成物の拡散、減衰が反応物の拡散であることが分かった。また、決定されたそれぞれの拡散係数の値は、反応物がPixD10-PixE5複合体、生成物がPixD二量体およびPixE単量体として妥当な値であった。よって、これまではゲル濾過という定常的な方法でしか検出できなかったPixD-PixE複合体の解離反応が、時間分解で観測できたことがわかる。

励起分子数で規格化されたこれらの信号は、その強度が時間に強く依存していた(図3)。信号強度は反応物と生成物の拡散係数の差を反映するため、このことは、この時間スケールで拡散係数変化を伴う反応が起こっていることを示している。そこで拡散係数の時間依存性を取り入れた解析式を用いて信号強度をグローバルフィッティングすることにより、拡散係数変化速度を500 msと決定することができた。測定・解析の原理、および得られた結果から考察されるシグナル伝達機構の詳細について発表する。

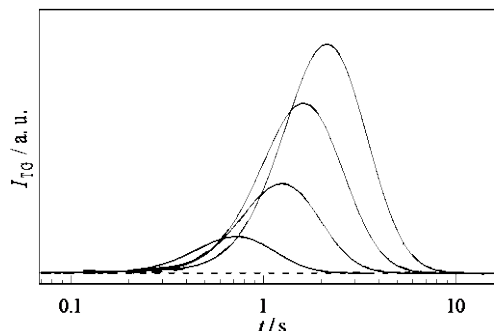


図 3. PixD-PixE サンプルの TG 信号

参考文献

1. *Biochemistry*. (2006) ,45, 12687-12694.
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (2008), 105, 11715-11719.