

## 全長の青色光センサータンパク質 YtvA の光化学反応ダイナミクス

(京都大学<sup>1</sup>, アムステルダム大学<sup>2</sup>) 崔 錫宇<sup>1</sup>, 中曾根 祐介<sup>1</sup>, Hellingwerf KJ<sup>2</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1</sup>

### The photochemical reaction dynamics of full-length of blue light sensor protein YtvA

(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Amsterdam Univ.<sup>2</sup>) Seokwoo Choi<sup>1</sup>, Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Hellingwerf KJ<sup>2</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

**【序】** 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の青色光センサータンパク質である YtvA (261 残基) は転写因子である  $\sigma^B$  の活性調節を介して環境ストレス (光、熱、塩濃度など) に対する応答を制御する [1]。その構造は光受容を担う LOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメイン、活性部位である STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) ドメイン、そしてこれらをつなぐ linker ドメインからなっている。これまで YtvA の機能に関する報告は多数あるものの、YtvA の光励起によるシグナル伝達過程に関してはほとんど明らかにされていない。そこで我々は分子レベルでの YtvA の光反応ダイナミクスを調べるため、主に過渡回折格子 (Transient Grating, TG) 法を用いて研究を行ってきた。我々は全長の YtvA の光反応ダイナミクスを考察する前に、機能やシグナル伝達過程において重要なドメイン単位で切り取ったサンプル YLOV (LOV ドメインのみからなるサンプル) と YLOV-linker (LOV ドメインにヘリックスである linker ドメインが付随しているサンプル) それぞれの光反応ダイナミクスを明らかにした。YLOV の場合、基底状態でテトラマーとダイマーの平衡が存在し、光励起によりテトラマーは解離反応を起こし、ダイマーは会合反応を起こすことが分かった。また、YLOV-linker では、基底状態で多量体とダイマーの平衡が存在し、光励起により多量体は吸収スペクトル変化のみを起こし、ダイマーは吸収変化に加え体積変化を伴う構造変化を起こすことが分かっている。今回の発表では、STAS ドメインまで含む全長 YtvA の光反応ダイナミクスについての結果を報告し、これまでに報告した YLOV と YLOV-linker の結果と比較・検討する。

そこで我々は分子レベルでの YtvA の光反応ダイナミクスを調べるため、主に過渡回折格子 (Transient Grating, TG) 法を用いて研究を行ってきた。

我々は全長の YtvA の光反応ダイナミクスを考察する前に、機能やシグナル伝達過程において重要なドメイン単位で切り取ったサンプル YLOV (LOV ドメインのみからなるサンプル) と YLOV-linker (LOV ドメインにヘリックスである linker ドメインが付随しているサンプル) それぞれの光反応ダイナミクスを明らかにした。YLOV の場合、基底状態でテトラマーとダイマーの平衡が存在し、光励起によりテトラマーは解離反応を起こし、ダイマーは会合反応を起こすことが分かった。また、YLOV-linker では、基底状態で多量体とダイマーの平衡が存在し、光励起により多量体は吸収スペクトル変化のみを起こし、ダイマーは吸収変化に加え体積変化を伴う構造変化を起こすことが分かっている。今回の発表では、STAS ドメインまで含む全長 YtvA の光反応ダイナミクスについての結果を報告し、これまでに報告した YLOV と YLOV-linker の結果と比較・検討する。

**【実験】** YtvA の光反応ダイナミクスを調べる上で、主に TG 法を用いて測定を行った。図 2 のように、TG 法では 2 本の励起光を交差させることでサンプル溶液中に干渉縞を作り、光強度の強い領域で空間特異的にタンパク質分子を励起する。その結果、励起分子の反応に伴い溶液の屈折率が変化し、過渡的な回折格子が形成される。そして probe 光を Bragg 条件を満たすように入射することで回折光が得られ、その時間変化を解析することにより、励起分子の反応過程、拡散過程、始状態からのエンタルピー変化 ( $\Delta H$ ) や体積変化 ( $\Delta V$ ) などを評価することができる。

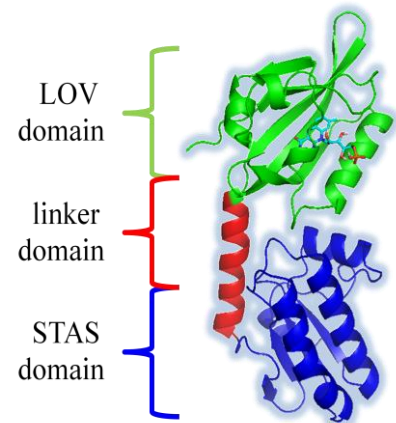


図 1 YtvA の立体構造

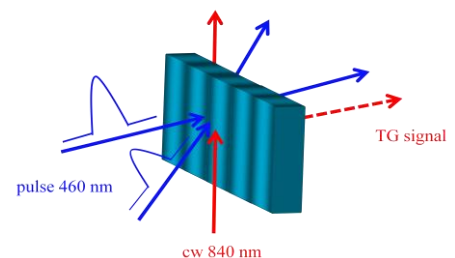


図 2 TG 法の原理

**【結果と考察】** 図3に YtvA の TG 信号(700  $\mu$ M, 20 $^{\circ}$ C)を示す。早い時間スケールから順に発色団近傍の構造変化(発色団と Cys 残基の共有結合形成)、熱拡散信号、そして分子拡散由来の信号が観測された。分子拡散信号は立ち上がり成分と減衰成分からなり、屈折率変化の符号から立ち上がりが反応物の拡散、減衰が生成物の拡散によるものであることがわかった。詳しい解析により、反応物・生成物の拡散係数の値はそれぞれ  $D_{\text{Reactant}} = 6.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と  $D_{\text{Product}} = 5.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であると見積もられた。拡散係数と分子のサイズには相関があり、反応物の拡散係数の値から YtvA は基底状態でダイマーとして存在することが示唆され、これは NMR を用いた先行研究の結果とも一致する[2]。また、拡散係数変化の度合いから、光励起により YtvA の会合状態は変わっていないことが予想され、観測された拡散係数変化は YtvA 分子の構造変化に起因すると考えられる。X線小角散乱測定によると、光照射により LOV ドメインと STAS ドメイン間の相対的な角度が回転する様子が報告されているため[3]、本研究で捉えた拡散係数変化はこの反応に由来するものであると解釈している。YLOV-linker ではより大きな拡散係数変化 ( $D_{\text{Reactant}} = 7.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と  $D_{\text{Product}} = 6.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ) が観測されており、これは linker 部分の構造変化に帰属しているが、STAS ドメインが存在することにより linker 領域の自由度が減少し、その構造変化も抑えられたのではないかと考えている。

YtvA の会合状態については別の手法としてゲルろ過クロマトグラフィーを用いて検証を行った(図4)。その結果、基底状態で YtvA はダイマーとして存在し、さらに光を照射しても分子量の変化は観測されなかった。したがって YtvA は暗状態・明状態に関わらずダイマーとして存在することを確認した。この会合状態に関する結果は、YLOV や YLOV-linker で得られた結果とは異なる。つまり YLOV や YLOV-linker では会合状態の変化が顕著であったが、全長 YtvA では比較的安定にダイマーとして存在しており STAS ドメインの存在が分子間相互作用にも影響を与えていることが分かる。これらの結果からもドメイン間の相互作用がタンパク質の性質を決める上で重要な役割を持ち、linker ドメインを介して起こる LOV ドメインと STAS ドメインの相対的な動きが信号伝達に重要であろうと推察される。現在、YLOV や YLOV-linker で観測された塩濃度依存性や温度依存性についても全長タンパク質を用いて検証を行っており、様々な環境ストレスに対する応答を分子レベルで明らかにしつつある。本討論会ではこれまで得られた結果をまとめて YtvA がストレス情報をどのように受け取り伝達しているのかについて議論する予定である。

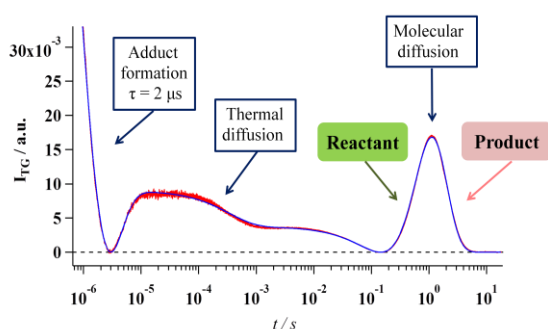


図3 YtvA の TG 信号(700  $\mu$ M, 20 $^{\circ}$ C)

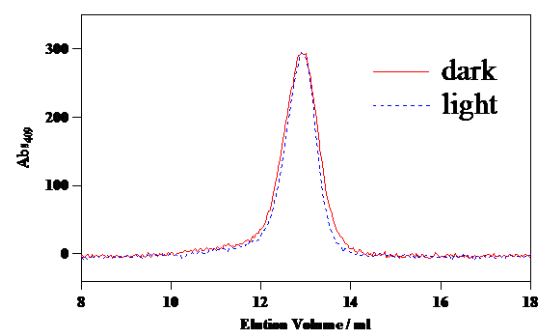


図4 YtvA のゲルろ過クロマトグラフィー

- Reference [1] Samina Akbar et al. *J. BACTERIOL.*, 2001, 183, 1329-1338  
 [2] Marcel Jurk et al. *J. Mol. Biol.*, 2010, 403, 78-87  
 [3] Marcel Jurk et al. *Biochemistry*, 2011, 50, 8163-8171