

3P-081

光センサー蛋白質フォトトロピンの活性状態における構造揺らぎの評価

(京大院理¹、大阪府立大院理²) 中曽根祐介¹、直原一徳²、徳富哲²、寺嶋正秀¹

Structural fluctuation of signaling state of light sensor protein phototropin

(Kyoto Univ.¹, Osaka Prefecture Univ.²) Yusuke Nakasone¹, Kazunori Zikihara², Satoru

Tokutomi², Masahide Terazima¹

【序】 一般的に蛋白質が機能するには特定の立体構造を持つ必要がある。現在、結晶解析やNMRにより数多くの蛋白質構造が決定され、それを基に蛋白質の活性部位や信号伝達経路が議論されている。しかし、自然界においては蛋白質は絶えず熱揺らぎにさらされており、信号伝達のオン・オフは分子レベルで見ると確率的な現象であると考えられる。従って蛋白質機能の本質を理解するには、蛋白質分子の揺らぎを検出する必要がある。

植物において青色光センサーとして働くフォトトロピンは、LOV ドメインと呼ばれる光センサードメインを有する。この LOV ドメイン内部にはフラビン分子 (FMN) が発色団として含まれ、光照射により FMN とその近傍に位置する Cys 残基が共有結合を形成する。この反応がドメイン全体の構造変化を引き起こし下流への信号伝達を達成すると考えられるが、実際には LOV ドメイン自体の構造は光照射により変化せず、その代わりに LOV ドメインの C 末端側に存在する J α と呼ばれるヘリックスが LOV ドメインから解離し、ほどけることがわかっている (図 1) [1]。この

解離反応が誘起されるメカニズムは構造解析の結果のみでは予測不可能であったが、MD シミュレーションによると光照射によって LOV ドメイン内のループ領域の揺らぎが大きくなると報告されている [2]。このループ領域は J α ヘリックスと隣接していることから、結合部位の揺らぎが増大したことにより J α ヘリックスの解離が引き起こされ、さらなる構造変化に至ったと推察される。我々はこうした機能につながる揺らぎの変化を実測することを目的として研究を行っている。

具体的には蛋白質の構造揺らぎを反映する熱膨張係数に着目し、その変化を過渡レンズ法・圧力摂動熱量計などを用いて測定した。

【実験】 熱膨張係数はエントロピーと体積の分散度合いに依存するパラメータであり、蛋白質においてはその構造揺らぎを反映する。熱膨張係数は反応における体積変化量の温度依存性から見積もることができ、過渡レンズ測定によりこれを評価した。過渡レンズ測定は励起パルス光 (460nm)により蛋白質を励起し、光反応に伴う溶液の屈折率変調をレンズ効果として検出する手

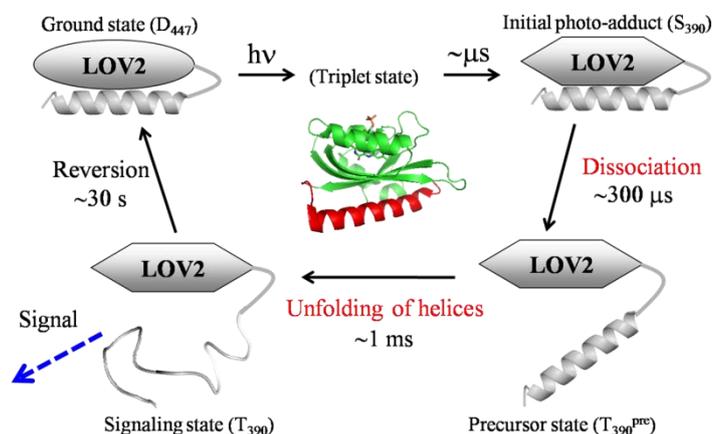


図 1 LOV2-J α の光反応

法である。得られた信号を解析することにより反応に伴う体積変化量を時間分解で測定することが出来るため、その温度変化から反応中間体における熱膨張係数を評価することが出来る。また別の手法として圧力摂動熱量計を用いたが、この手法では蛋白質溶液にかかる圧力を瞬間的に増減させ、それに応じて吸収あるいは放出される熱を高感度で検出し、そこから熱膨張係数を見積もる。各温度で直接熱膨張係数を見積もることが出来る優れた手法であるが、測定に時間がかかるため LOV ドメインのように早い時間で基底状態に戻るような系では光状態の評価をすることが出来ない。したがって、光状態をミミックするため J α ヘリックス内に位置する Val601 を Glu に置換した変異体を作成した。この置換により LOV ドメインと J α ヘリックスの相互作用が不安定化し、暗状態でもヘリックスを解離させることができる。この変異体と Wild Type (WT) とを比較することにより、異なる手法を用いて活性状態における揺らぎの評価を行った。

【結果と考察】 図2に温度を5~30度の範囲で変化させた時の LOV2-J α (WT) 試料の過渡レンズ信号を示す。この信号にはヘリックスの解離反応に伴う体積変化およびヘリックスの崩壊過程に伴う体積変化による寄与が含まれている。その体積変化量が温度に依存する様子が観測され、解析の結果、ヘリックスが壊れる過程において熱膨張係数が増加することが明らかになった。このことから活性状態において蛋白質全体の揺らぎが増大することがわかった。また V601E ミュータントに関しては CD 測定により暗状態でも J α ヘリックスが壊れている様子が観測され、活性状態を再現できていることを確認した。そして圧力摂動熱量測定を行ったところ、図3に示すように WT (暗状態) よりも熱膨張係数が大きいことがわかった。この結果は熱レンズ測定の結果と一致しており、ヘリックス崩壊過程により構造揺らぎが増加することを支持している。ヘリックスが解離するには LOV ドメイン自体の揺らぎの変化が重要であろうと考えられているが、これは発色団と Cys 残基が共有結合を形成する際に起こると予想される。しかし、この過程では吸収スペクトル変化が起こるため、過渡レンズ測定では体積変化および吸収変化の寄与が混在し、体積変化量の正確な見積もりが困難である。したがって現在は共有結合形成に伴う体積変化を光音響信号として検出しようと試みており、この温度依存性から LOV ドメイン自体の揺らぎの変化を評価することを目指している。本討論会ではこれらの結果を基にフォトトロピンの光反応と構造揺らぎの関係を議論する。

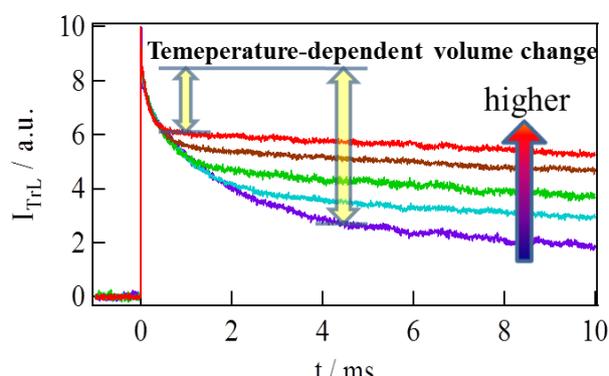


図2 WT 試料の過渡レンズ信号の温度依存性

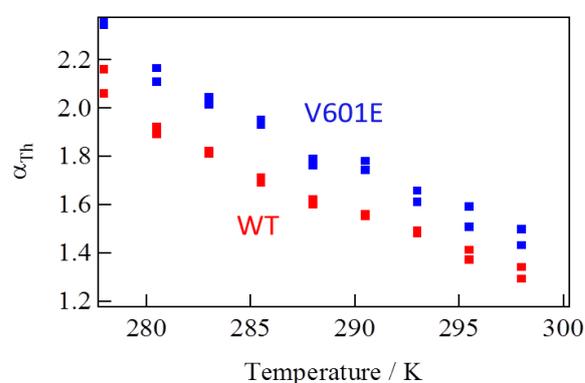


図3 WT, V601E の熱膨張係数の温度依存性

【参考文献】

- [1] Harper et al. *Science*. (2003) 301:1541-4. Nakasone et al. *J Mol Biol*. (2007) 367:432-42.
- [2] Freddolino PL et al. *Biophys J*. (2006) 91:3630-9.