

3P-083

過渡回折格子法による UV-B 光センサータンパク質
UVR8 のカイネティックスの測定

(京都大学¹, Scripps 研究所², Glasgow 大学³)

宮森一彰¹ 中曽根祐介¹ 人見研一²

Christie John M³ Getzoff Elizabeth D² 寺嶋 正秀¹

Study on the Kinetics of UV-B light sensor protein UVR8 by the
method of Transient Grating

(Kyoto Univ.¹, Scripps Institue², GlasgowUniv.³)

Takaaki Miyamori¹ Yusuke Nakasone¹ Kenichi Hitomi²

Christie John M³ Getzoff Elizabeth D² Masahide Terazima¹

【序】 シロイヌナズナ由来の紫外光センサータンパク質 UVR8 は、UV-B(280-315nm)を受けると下流分子と相互作用し植物体内で紫外光から身を守るための遺伝子発現を制御する。興味深いことに一般的な光センサータンパク質とは異なり、発色団を持たずトリプトファンがクラスター構造を形成することによって光吸収すると考えられている。実際に X 線結晶解析により得られた構造を見ると[1]、図 1 のように UVR8 は暗状態でダイマーを形成しており、このダイマーのインターフェイスにトリプトファンが集まりクラスターを形成している。そして紫外光照射によりトリプトファンが励起されると蛋白質間の相互作用変化を引き起こし、最終的にモノマーへ解離するということが報告されているが、その詳細については不明な点が多い。

また UVR8 の総アミノ酸残基数は 440 であり、先の X 線結晶解析では N 末端 13 残基、C 末端 44 残基を除いた 383 残基の Core と呼ばれる部分が用いられている[1]。しかし、切り取られた C 末端領域が下流分子との相互作用に重要であるという報告があるため[2]、シグナル伝達過程を明らかにするには C 末端領域も含めた UVR8 の反応ダイナミックスの検出が必須である。さらに共同研究者が行った X 線小角散乱測定によると C

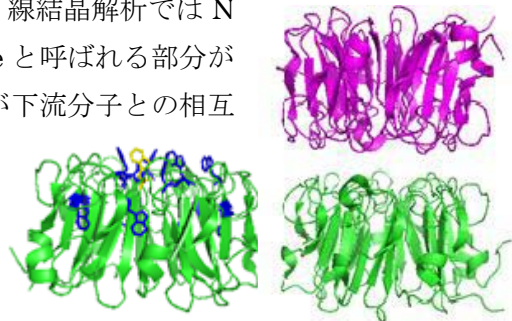


図 1 UVR8-core の結晶構造
左の青と黄が Trp クラスター、
右がダイマー構造を示している

末端領域はダイマーのうちの違った分子のコアに結合しているというランスモデルと、同一分子内で結合しているというシスモデル (図 2) が提案されており (unpublished)、この領域の動きを捉えることはシグナル

伝達過程を明らかにするうえで重要となる。本研究ではこれらのダイナミックスを含め UVR8 がどのように光情報を伝達するのかを明らかにするために、過渡回折格子法(TG 法)を中心に種々の分光法を用いて実験を行った。

【実験】 C 末端領域の構造変化についての知見を得るために、サンプルとして全長 UVR8 (WT) と C 末端領域を切った UVR8 (Core) を用意し測定を行った。TG 測定では、ポンプ光として Nd-YAG レーザーの四倍波(266nm)、プローブ光として連続発振のブルーレーザー(449nm)を用いて様々な時間スケールでの反応ダイナミックスを測定した。

【結果と考察】 WT と Core を紫外光で光励起したのちに観測される TG 信号を図 3 に示す。赤と青がそれぞれ Core、WT の分子拡散信号であり、強度は信号を比較するためピーク強度で一致させている。分子拡散信号は

$$I_{TG}(t) = \{\delta n_P \exp(-D_P q^2 t) - \delta n_R \exp(-D_R q^2 t)\}^2$$

という式で表され、 δn が屈折率の変化、 D が拡散係数、 q が格子波数であり、添え字の P、R はそれぞれ生成物、反応物を示している。図 3 に示したとおり分子拡散信号は立ち上がりと減衰からなり、光反応において拡散係数が増えるような蛋白質全体の反応が起こっていることがわかった。屈折率変化の符号から、立ち上がりが生成物の拡散、減衰が反応物の拡散に対応していることもわかり、上式を用いて解析した結果、WT では D_R 、 D_P がそれぞれ約 $5.0 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、Core ではそれぞれ $5.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ と $7.0 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ と見積もられた。WT と Core とで値が異なるのは C 末端領域を切ったことにより分子サイズが小さくなったことが原因だと考えられる。両方の試料で拡散係数が大きくなる様子が観測されたが、その変化の度合いとストークス・アインシュタインの関係式を用いて WT、Core それぞれの反応物/生成物の体積比を求めると、どちらもおよそ 2 倍になると見積もられた。このことからダイマーがモノマーに解離する過程を拡散係数変化として捉えたと考えられる。格子波数を変えて拡散信号の測定を行ったところ拡散信号の強度や形が時間変化する様子も観測され、モデルを用いた解析の結果、Core 試料ではダイマーがモノマーに解離する速度を見積もることに成功した ($\sim 20 \text{ms}$)。しかし、WT では同様の解析では信号を綺麗に再現することが出来ず、解離過程以外にも反応が起こっていることが示唆された。我々はこの反応を C 末端領域の動きと考えている。

これまでの実験では解離後の時間スケールで観測される TG 信号には WT と Core とで目立った差がなかったことから、C 末端領域の反応は解離過程より早い段階で起こる、あるいは解離過程と同期して起こるのではないかと推察される。今現在、WT に関して C 末端領域の動きも含めた詳しい解析を行っており、Core の信号と比較することで最終的にはシス、トランスどちらのモデルが正しいかなど反応の詳細を明らかにする予定である。本討論会では TG 測定と並行して行っている CD 測定や過渡吸収の結果も含めて報告し、UVR8 が光センシングするメカニズムについて議論する。

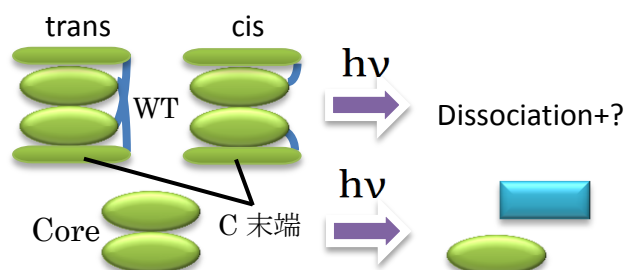


図 2 UVR8 の反応スキーム

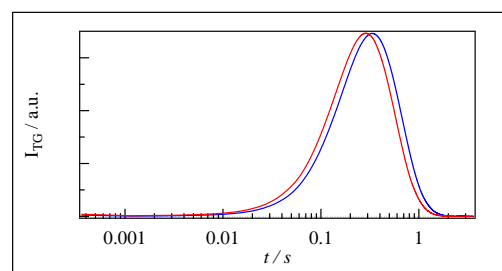


図 3 赤:Core 青:WT の TG 信号

「参考文献」

[1] John M. Christie et al. *Science*. 335 : 1492-1496.

[2] Brown BA et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(50):18225-18230