

2P084

## フォトリロピン LOV2 ドメインの光反応短寿命中間体の揺らぎ

(京大院理<sup>1</sup>、マリンガ大<sup>2</sup>、大阪府立大院<sup>3</sup>) 黒井邦巧<sup>1</sup>・佐藤フランシエーレ<sup>2</sup>・中曾根祐介<sup>1</sup>・直原一徳<sup>3</sup>・徳富哲<sup>3</sup>・寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Fluctuation of short-lived intermediates during the photoreaction of the LOV2 domain of photoropin

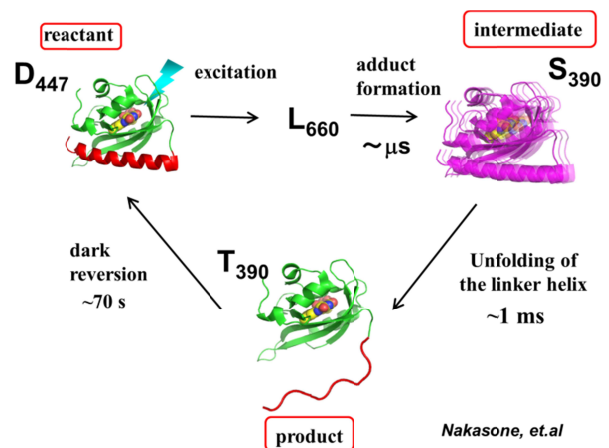
(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Univ. of Maringa<sup>2</sup>, Osaka Prefecture Univ.<sup>3</sup>) ○Kunisato Kuroi<sup>1</sup>, Francielle Sato<sup>2</sup>,

Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Kazunori Zikihara<sup>3</sup>, Satoru Tokutomi<sup>3</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

【序】タンパク質分子は一般に不完全なパッキングにより生じる多くのキャビティーを持つため、その構造は自由度の高い柔らかな構造と言えるだろう。このような構造の柔らかさはタンパク質に自発的な揺らぎを与え、タンパク質機能と密接な関係があると指摘されている。このようなタンパク質分子の柔らかさの実測は困難を伴うが、圧力摂動に対する応答を捉えることでその検出が可能である。実際に音速分散測定や高圧 NMR などによってこうした揺らぎの研究がなされているが、これらの研究は定常状態の測定に限られており、生体反応における短寿命中間体に対しては適用が不可能であった。そこで我々は高い時間分解能で揺らぎを捉えるべく、過渡回折格子法 (Transient Grating; 以下 TG 法) および過渡レンズ法 (Transient Lens; 以下 TrL 法) による測定を高圧条件下で行った。これらの手法 (TG 法、TrL 法) はタンパク質反応に伴う溶液の屈折率変化を検出するため、反応過程における体積変化量を算出することが可能である。さらにその圧力依存性から中間体の等温圧縮率変化を求めることができるが、この等温圧縮率は『体積揺らぎ』と直接結びつくパラメーターであるため、中間体におけるタンパク質分子の柔らかさを定量的に評価することが可能である。

本研究では植物由来の青色光センサータンパク質であるフォトリロピンの LOV2-J $\alpha$  ドメインの光反応に伴う圧縮率の変化を検出した。LOV2-J $\alpha$  ドメインは LOV2 ドメインと J $\alpha$  と呼ばれる C 末端ヘリックスから成り、図 1 のような光反応を起こすことが知られている。すなわち光励起後トリプレット L<sub>660</sub> を形成し、続いて発色団と LOV ドメイン内部のシステイン残基が共有結合を形成して S<sub>390</sub> 状態となり、最終的に J $\alpha$  がアンフォールディングを起こしてシグナリング状態 T<sub>390</sub> となる[1,2]。今回これら各中間体が持つ圧縮率を検出することに成功し、基底状態よりも大きく揺らいでいることが示唆されたので本討論会で報告する。

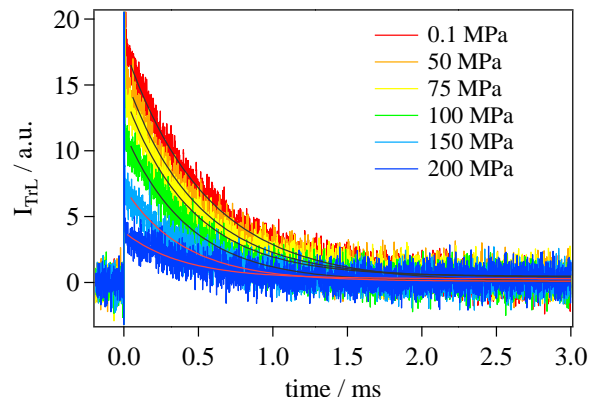
【実験】フォトリロピン試料溶液をシリコンチューブが付いたインナーセルに封入して高圧光学セル[3]内で TG 信号および TrL 信号を測定した。測定圧力範囲は 0.1 MPa から 200 MPa であり、



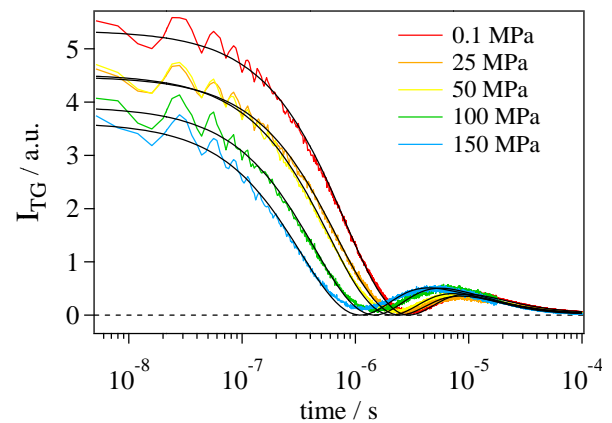
て緑で  
で示し

この圧力下ではタンパク質の変性が起こらないことを確認した。TG 信号の測定には励起パルス光に波長 460 nm の色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長 840 nm のダイオードレーザーを用いた。TrL 信号の測定には連続プローブ光として波長 633 nm の He-Ne レーザーを用い、体積変化量の算出は同一条件下で測定した熱参照試料の信号強度との比較により行った。

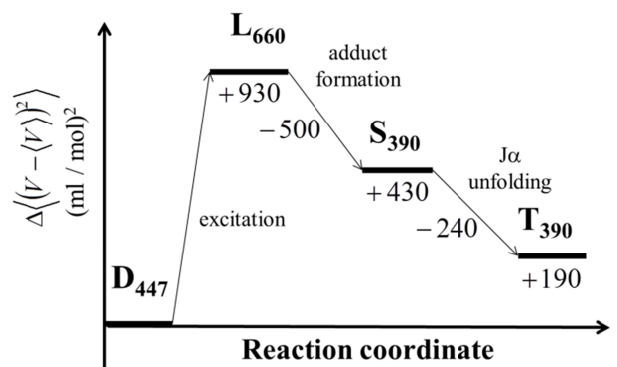
【結果と考察】図 2 に圧力を 0.1 MPa から 200 MPa まで変えて測定した TrL 信号を示す。この減衰曲線は約 1 ms の時定数で起こる J $\alpha$ ヘリックスのアンフォールディングに伴う体積変化に起因し、その信号強度は体積変化量に比例する。したがってその圧力依存性を解析することにより、圧縮率（体積揺らぎ）の変化を求めることができる。その結果、ヘリックス崩壊過程における体積揺らぎの変化は  $-240 \text{ (ml/mol)}^2$  であると求められた。さらに遅い時間スケールの信号強度に対して同様の解析を行った結果、T<sub>390</sub> 状態（シグナリング状態）と基底状態の体積揺らぎの差が求められ、 $+190 \text{ (ml/mol)}^2$  であった。すなわち T<sub>390</sub> 状態は基底状態よりも大きく揺らいでいることが分かった。



次に図 3 に 0.1 MPa から 150 MPa までの圧力範囲で測定した TG 信号を示す。この信号は LOV ドメインと発色団の間の共有結合形成過程を捉えており、信号の圧力依存性から L<sub>660</sub> 状態から S<sub>390</sub> 状態に移る過程において体積揺らぎが  $-500 \text{ (ml/mol)}^2$  という大きな変化を起こすことが分かった。



以上の結果から図 4 のように各中間体における体積揺らぎを基底状態からの差として得ることができた。初期過程において大きく増幅し、その後徐々に減少する様子が観測されたが、これは分子内のキャビティー量の変化や、溶媒分子との水和状態が反応に伴い変化した結果であると考えられる。X 線結晶解析では LOV ドメイン自身は光励起で大きな構造変化を起こさないことが知られているが、今回の結果から平均構造が変わらなくとも励起状態においてより柔らかな構造となっていることが示唆され、それがフォトトロピンの大きな構造変化を引き起こすトリガーになっているのではないかと推測される。



#### 【参考文献】

- [1]Harper et al. *Science*. (2003) 301:1541-4.
- [2]Nakasone et al. *J Mol Biol*. (2007) 367:432-42
- [3]Hoshihara et al. *Rev Sci Instrum*. (2008) 79