

3D17

青色光センサータンパク質フォトロピン1LOV2ドメインの N 末端ヘリックスの構造変化ダイナミクスの検出

(京大院理¹, 大阪府立大院²) ○武田公利¹, 中曽根祐介¹, 直原一徳², 徳富哲², 寺嶋正秀¹

Conformational dynamics of the N-terminal helical region of the phototropin1 LOV2 domain

(Kyoto Univ¹, Osaka Prefecture Univ²) ○Kimitoshi Takeda¹, Yusuke Nakasone¹, Kazunori Zikihara², Satoru Tokutomi², Masahide Terazima¹

【序】 フォトロピンは高等植物の光屈性や気孔の開閉といった生理機能を制御する青色光センサータンパク質である。その構造は N 末端側に光受容を担う 2 つの LOV (Light-Oxygen-Voltage) ドメイン(LOV1, LOV2)、C 末端側にキナーゼドメインを持ち、キナーゼと LOV2 を結ぶ領域をリンカードメインと呼ぶ。2 つの LOV ドメインのうち LOV2 がキナーゼの活性を支配的に制御しており、その信号伝達にはリンカーに存在するヘリックス(J α)の構造変化が重要だと広く認識されている。また、先行研究によりその構造変化の反応ダイナミクスも明らかになっている[1]。しかし生理化学的な研究により、単離したキナーゼと LOV2(リンカー無し)の混合溶液でもキナーゼの活性が光制御されると報告され[2]、リンカーのみがキナーゼへの信号伝達を担うという見解を覆す多くの議論を呼んでいる。そこで我々は信号伝達経路の新たな可能性として LOV2 ドメインの N 末端側に存在する短いヘリックス構造(A' α)に着目した。A' α は様々なフォトロピンにおいてアミノ酸配列が保存されており、この部分に変異をかけると生理機能を示さなくなるという報告があるためである[3]。本研究では A' α と J α の相互作用および A' α の構造変化ダイナミクスを明らかにするために様々な変異体を作成し、これらの二次構造及び反応ダイナミクスの測定をおこなった。



図 1: LOV2 ドメイン周りの結晶構造

【実験】 本研究では先行研究を参考にして遺伝子操作により様々な変異体を作成した。具体的には J α のヘリックス構造を壊した I608E, A' α のヘリックス構造を壊した T469I, A' α ヘリックスを取り去った Δ A' α である(図 2)。これらの変異体について円二色性偏光(CD)を用いて二次構造を測定し、2 つのヘリックスの相互作用を考察した。またそれぞれのヘリックス領域の光反応ダイナミクスを調べるため過渡回折格子(TG)法による測定を行った。

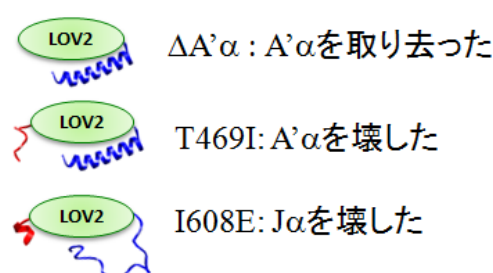


図 2: 実験に用いた変異体

TG 法は体積変化や拡散係数変化を介してタンパク質分子の構造変化を溶液中で時間分解検出できる手法である。励起パルス光に波長 462nm の色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長 835nm のダイオードレーザーを用いた。

【結果と考察】 各サンプルの暗状態における CD スペクトルの測定結果を図 3 に示す。ヘリックス構造に由来する 222nm 付近のスペクトル強度を比較してみると、WT と比べて I608E の CD 強度は大きく減少し、T469I の強度の減少量は小さかった。A'α に比べて Jα は大きいので、この結果は妥当な結果であり、変異をかけることによりそれぞれのヘリックスが暗状態で壊れていることを確認できた。次に、A'α を取り去った ΔA'α の CD スペクトルを測定すると、CD 強度は A'α を壊した T469I よりもさらに減少し、Jα を壊した I608E に近い値を示した。これは A'α を取り去ることによって Jα ヘリックスの安定性が失われ、部分的にヘリックス構造が壊れたためと考えられる。この A'α 領域と Jα ヘリックスの相互作用は MD シミュレーションを用いた先行研究からも指摘されており、その結果を実験的に支持している[4]。しかし、A'α のヘリックス構造自体は Jα 安定性に関与していなかったことから、両ヘリックス内の特定のアミノ酸残基間(おそらく Lys475 と Thr604)の水素結合によりその安定性が保たれていると考えられる。

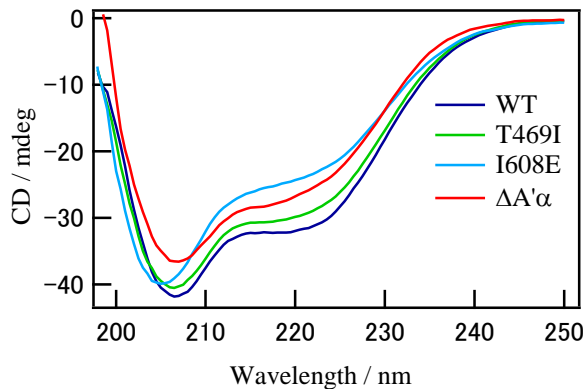


図 3: 各サンプルの CD スペクトル

図 4 に各サンプルの TG 信号($q^2 = 4.4 \times 10^{10} \text{ m}^{-2}$, 23°C, 25μM)を示す。得られた信号は励起分子数で規格化しているが、分子拡散信号の強度が変異をかけることにより大きく変化することがわかった。分子拡散信号は光反応における両末端ヘリックスの構造変化を反映しており、ヘリックスの崩壊度合が大きいほど強くなるという挙動を示す。図 4 より WT の信号強度が最も強いことがわかるが、これは A'α と Jα 両方の

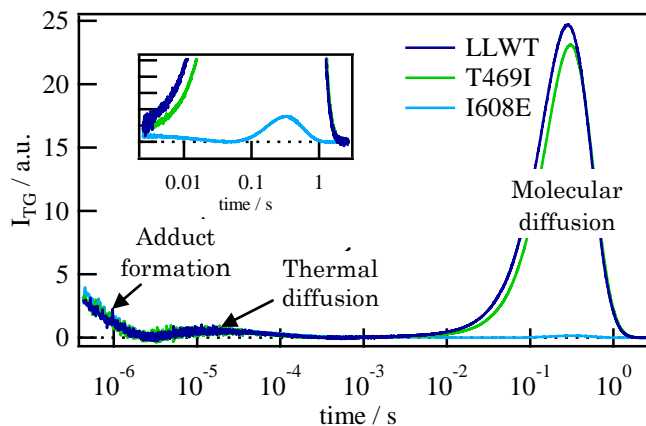


図 4: 各サンプルの TG 信号

ヘリックスが崩壊したためである。一方、T469I の分子拡散信号は WT よりわずかに小さく、I608E では大きく減少する様子が観測された。これはそれぞれ短い A'α と長い Jα を予め壊しているため、光反応におけるヘリックス崩壊量が異なるためである。さらに様々な格子波数で TG 信号の測定を行った結果、分子拡散信号の強度が時間発展する様子が観測され、速度論的な解析から各ヘリックスの崩壊反応速度を見積もることに成功した。その結果、T469I (Jα の崩壊) は 1ms、I608E (A'α の崩壊) は 12ms と求められた。以上の結果などを総合的に考察し、我々は A'α と Jα という二つのヘリックスはそれぞれ独立に構造変化しているという結論を導いた。

Reference

- [1] Nakasone et al. J Mol Biol. (2007), 367: 432-42 [2] Matsuoka et al. PNAS. (2005), 1028(37): 13337-13342
 [3] Aihara et al. J. Biol. Chem, (2012), 287, 13 [4] Zayner et al. J. Mol. Biol. (2012), 419, 61-74