

UV-Bセンサータンパク質UVR8の解離反応に重要な構造変化検出

(京都大学*, Scripps 研究所**, Glasgow 大学***) ○宮森一彰*, 中曽根祐介*
人見研一**, Christie John M***, Getzoff Elizabeth D**, 寺嶋 正秀*

Study on the molecular mechanism of dissociation dynamics of UV-B sensor protein UVR8

(Kyoto Univ.*, Scripps Research Institute**, Glasgow Univ.***)

○Takaaki Miyamori*, Yusuke Nakasone*, Kenichi Hitomi**

Christie John M***, Getzoff Elizabeth D**, Masahide Terazima*

【序】シロイヌナズナ由来の UV-B (280-315nm) センサータンパク質 UVR8 は、紫外光ダメージからの防護・修復のための遺伝子発現を誘導する。その構造は図 1 に示すように 7 枚の β プロペラ構造がリング状に連なった形状を持つ。特徴的なのは計 14 個におよぶトリプトファンが規則正しく配置されており (図 1 の紫で示した個所)、中央に位置するトリプトファンクラスターが紫外光吸収を担っている点である。すなわち、一般的な光センサータンパク質は特定の発色団を有することで光を吸収するが、UVR8 はタンパク質のアミノ酸自体が光を吸収して反応する。UVR8 は電荷を持つアミノ酸が表面に多く配置されており、静電相互作用により暗条件ではダイマー構造を形成している。このダイマーに紫外光を照射するとモノマーへの解離反応が起こり、UVR8 モノマーの C 末端領域が下流分子である COP1 と相互作用することで信号伝達が達成される。

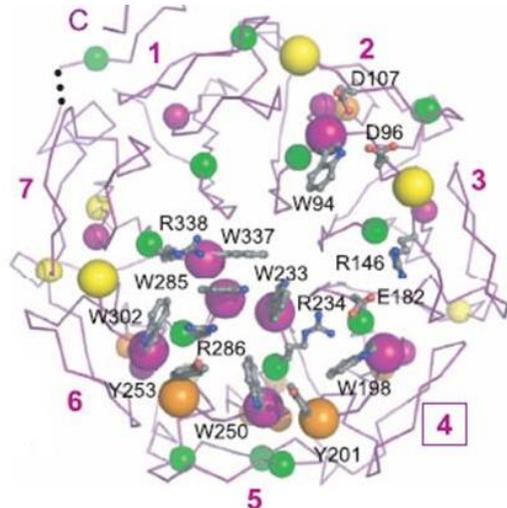


図 1 UVR8 の構造と重要な残基および β プロペラのナンバリング

我々はこれまで過渡回折格子 (TG) 法を用いて UVR8 の反応検出を行ってきた。過渡回折格子法は拡散係数変化という観点から分子の構造変化や分子間相互作用を高い時間分解能で捉えることができるため、UVR8 の光解離分子機構を明らかにすることができる。その結果、解離反応が光励起後約 100 ms で起こることを明らかにした。また解離反応の分子機構を探るため、暗状態でモノマーとして存在するようなミュータントの測定を行った。具体的には静電相互作用に重要な 2 つの Arg を Ala に置換した R146A/R286A の測定であり、その信号解析からモノマー内部の構造変化が 3 ms の時定数で起こることを見出した。しかし R146A/R286A の測定はモノマー内部の動きを調べるうえで重要であるが、R286 は紫外光吸収に重要なトリプトファンクラスターの近傍に位置するため、光反応への影響という懸念が残る。この問題を解消するため、今回 D96N/D107N という新たなミュータントを作成した。これら Asp はトリプトファンクラスターから離れた位置にありながら、Asn に置換することでモノマーとして安定に存在するようになる。

この試料の反応測定からモノマー本来の反応を明らかにできるだろう。さらに R338A というモノマーミュータントも作製した。R338A はトリプトファンクラスターに近い位置にあるため、光反応への影響が拭いきれないミュータントであるが、信号伝達への寄与が予想されている 1 番目と 7 番目の β プロペラに挟まれる位置にあるため、この領域の動きを捉える上で最適である。これらミュータントの測定により解離反応が引き起こされるメカニズムの解明を目指した。

【実験】TG 法を中心に種々の分光法を用いて、これらミュータントの光反応ダイナミクスを測定した。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)あるいは赤色レーザー(633nm)を用いて様々な時間スケールでの TG 信号を測定した。

【結果と考察】図 2 に D96N/D107N と R146A/R286A を同じ条件で測定した分子拡散信号を示す。ともに立ち上がりと減衰からなる信号が観測され、これは光励起によって拡散係数変化が誘起されたことを表している。つまりタンパク質構造が D96N/D107N でも変化したことを意味しているが、その信号強度は非常に小さいことがわかった。解析の結果、D96N/D107N では反応物と光生成物の拡散係数がそれぞれ $D_R=6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $D_P=6.8 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ と見積もられた。この変化量は R146A/R286A ($D_R=6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $D_P=7.2 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$) よりも小さいことから、ミューテーションの位置によって構造変化の様相が変わることがわかった。図 3 には D96N/D107N を様々な格子波数で測定して得られた分子拡散信号を示す。分子拡散信号は格子波数を変えることにより表れる時間スケールが変わるが、それに伴い信号の強度が大きく変化する様子が観測された。これは観測している時間スケールで拡散係数変化を伴う反応が起こっていることを意味しており、速度論的解析の結果、反応時定数は 50 ms と見積もられた。この値は WT における解離反応の速度に近く、同じモノマーである R146A/R286A より遅い。このことからミューテーションをかける位置によって反応速度にも影響があることがわかった。D96N/D107N が光反応に重要なクラスター構造を保持しているため、今後はこの結果を基にモノマー内の反応を議論する予定である。一方、R338A に対しても同様の解析を行った結果、反応物と生成物の拡散係数はそれぞれ $6.5 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、 $7.3 \times 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$ 、反応速度は 5.3ms と R146A/R286A の値と近い実験結果が得られた。これはトリプトファンクラスター周りの残基を変えると光反応に対して同様の効果があることを示唆している。現在は下流分子との相互作用に重要と考えられている C 末端領域の動きを捉えるため、全長 UVR8 から C 末端 57 残基を切ったミュータントを作成し測定を行っている。これらの結果を比較・検討することで光反応分子機構への理解を深めていく予定である。

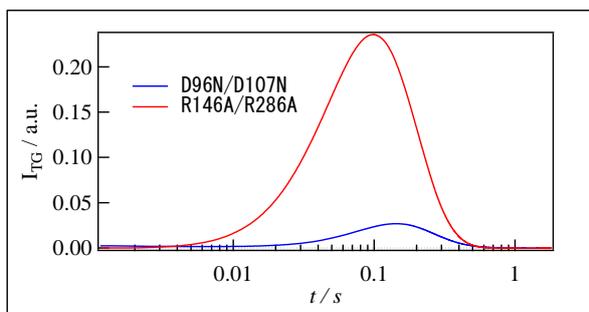


図 2 D96N/D107N と R146A/R286A の TG 信号比較

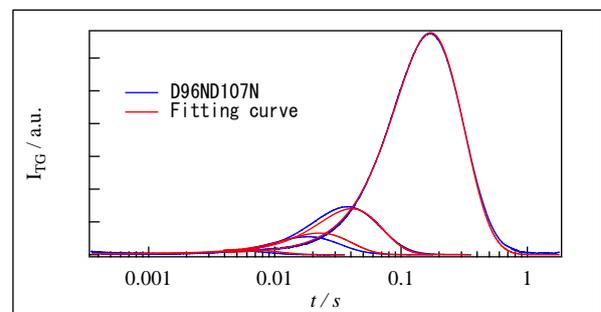


図 3 D96N/D107N の分子拡散信号の格子波数依存性