

青色光センサータンパク質 PapB のシグナル伝達反応機構

○菊川 耕太郎*、中曽根 祐介*、増田 真二**、寺嶋 正秀*

(京大院理*、東工大バイオ研究基盤支援総合センター**)

Signaling mechanism of blue light sensor protein PapB

○Kikukawa Koutaro*, Nakasone Yusuke*, Masuda Shinji**, Terazima Masahide*

(Dept. of Sci., Kyoto Univ.*, Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology**)

【序】光センサータンパク質は光をシグナルとして様々な生理活性を制御するタンパク質であり、その反応機構が多く興味を集めている。その一種である PapB は紅色性細菌 *Rhodospseudomonas palustris* 中に存在する青色光センサータンパク質であり、発色団 FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) を含む BLUF (Blue Light sensing Using FAD) ドメインを N 末端に持ち、C 末端側には 2 本のヘリックス構造を持つことが知られている。PapB はホスホジエステル加水分解酵素である PapA と相互作用することが報告されており、光照射によりこの相互作用が変化することで c-di-GMP の加水分解活性が上昇すると考えられている。c-di-GMP は細菌内でセカンドメッセンジャーとして働いており、その分解が進むことによって最終的にバイオフィーム形成が抑制される^[1]。この一連のシグナル伝達機構において、発色団 FAD が青色光を吸収した後、周囲のアミノ酸との水素結合ネットワークがピコ秒のオーダーでシフトする反応が過渡吸収測定などにより明らかにされているが、蛋白質全体の構造変化や PapA との相互作用変化を実時間で捉えた研究例はない。そこで我々は FAD の光励起からバイオフィームの制御という生理機能につながる分子機構を明らかにするために、PapB 全体の構造変化および PapA-PapB 間の相互作用変化を、過渡回折格子法を用いて時間分解検出することを目指した。

【実験】過渡回折格子(TG)法では励起光パルスとして波長 462 nm の色素レーザーを、プローブ光として 840 nm のダイオードレーザーを用いた。格子波数を変化させ、分子拡散信号の時間発展を解析した。Buffer は pH8.0 の Tris バッファーを用い、二重励起を防ぐために励起光パルスの入射は 0.03Hz の間隔で行った。サンプルとして野生型の PapB およびその C 末端ヘリックスを壊した変異体を用意し、さらに PapA を加えた系での測定も行って信号伝達過程の時間分解検出を試みた。

【結果と考察】野生型 PapB のバッファー溶液内での反応を過渡回折格子法により測定した結果を図 1 に示す。最初に減衰する強い信号は熱拡散信号に同定され、そのほかに時定数 50 μ s、25 ms の体積変化が観測されたのち、分子拡散による減衰信号が

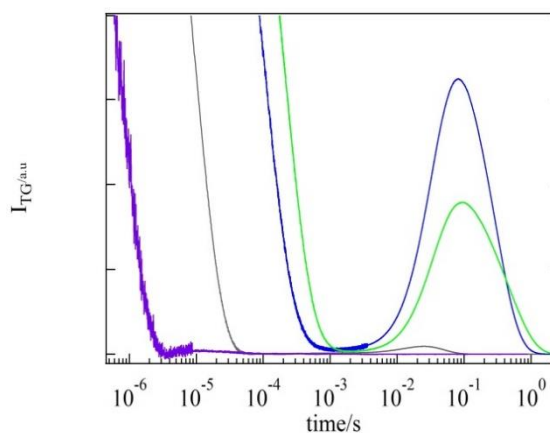


図 1 PapB 野生型の TG 信号

観測された。このうち、 $50 \mu\text{s}$ の成分は小さい体積膨張によるものであり、他の BLUF 蛋白質でも近い時定数の反応が観測されているため^[2]、BLUF ドメインの構造変化を捉えたと推測される。一方、 25 ms の成分は比較的大きな体積膨張反応であり、C 末端のヘリックスを壊した変異体での TG 測定 (図 2) では観測されなかったことから、この成分は C 末端にあるヘリックス構造の崩壊によるものと推定した。この崩壊反応は CD 測定によっても確認されている。一方、分子拡散信号に関しては反応物の拡散係数が

$8.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ から $9.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ と変化する挙動が観測された。この拡散係数変化は、先に示した C 末端のヘリックス構造の崩壊と、二量体から単量体への解離反応によるものと推測される。

次に PapB-PapA の混合系についても同様に過渡回折格子法による測定を行ったところ、図 3 に示すように PapB 単体とは明確に異なる信号が観測された。PapA はこの励起波長には光吸収を持たないため、この変化は PapA が PapB と相互作用していることを示している。PapA-PapB 混合系の信号のうち、熱拡散信号の後に観測される立ち上がり信号は PapB 単体の信号のそれと近い時間スケールで起きていることから、PapB でも見られた 25 ms の体積変化由来の信号であると推測される。すなわち PapA 存在下でも、PapB の C 末端ヘリックスの崩壊反応は保存されていると考えられる。そのあとの分子拡散信号は混合系固有の挙動であり、反応物の拡散係数が $5.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ から $3.6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ へと減少する挙動が観測された。この拡散係数変化は PapB と PapA の作る複合体が光依存的な会合もしくは部分的な構造の崩壊を伴う相互作用変化を起こしたものと予想される。現在これらの可能性を検証するために、濃度を振った測定や混合系での CD 測定を行っており、本討論会ではこれらの結果も含め PapA-PapB の信号伝達機構を議論する。

【参考文献】

- [1] Kanazawa et al. *Biochemistry*. 2010 Dec 21;49(50):10647-55
 [2] Tanaka et al. *J Mol Biol*. 2009 Mar 13;386(5):1290-300

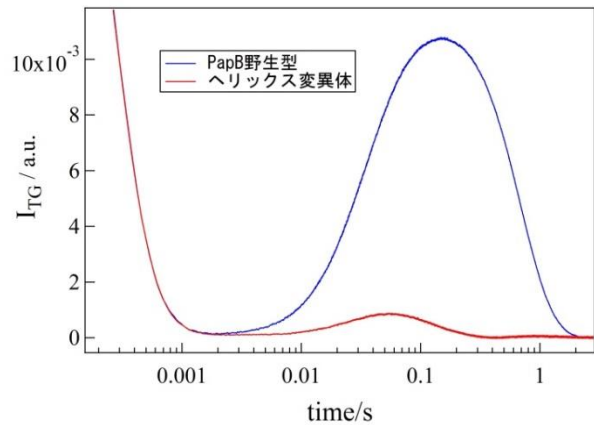


図 2 PapB 野生型と C 末端ヘリックスを壊した変異体との間の TG 信号比較

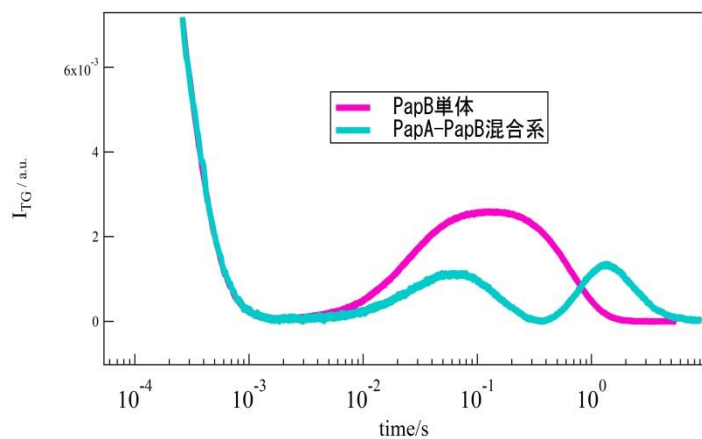


図 3 PapB 単体と PapB-PapA 混合系との間の TG 信号比較