

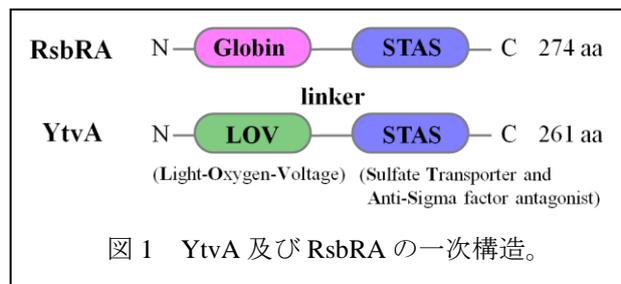
## 光シグナル伝達反応における YtvA の構造と 分子間相互作用変化の時間分解測定

(京都大学<sup>1</sup>, アムステルダム大学<sup>2</sup>) 崔 錫宇<sup>1</sup>, 中曽根 祐介<sup>1</sup>, Hellingwerf Klaas<sup>2</sup>, 寺嶋 正秀<sup>1</sup>

### Time-resolved study on light signal transduction of YtvA by structure and intermolecular interaction change

(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Amsterdam Univ.<sup>2</sup>) Seokwoo Choi<sup>1</sup>, Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Hellingwerf Klaas<sup>2</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

**【序】** 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は様々な環境ストレス(光、熱、塩濃度など)から身を守るため、リン酸化・脱リン酸化反応を伴う複雑なストレス応答システム(RsbRST stress module)を有する。このシステムの中で最初に環境ストレスを感知するのは Stressosome という分子複合体で、共通の STAS (Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist)ドメインを持つ RsbR パラログタンパク質から構成されている。その中で、光ストレス応答のために光受容するタンパク質が YtvA であり、N 末端に光受容を担う LOV (Light-Oxygen-Voltage)ドメイン、C 末端に活性部位である STASドメイン、そしてこれらをつなぐヘリックスの linkerドメインからなる。これまで YtvA の生理機能に関する報告は多数あるものの、分子レベルでのシグナル伝達機構に関しては未知な部分が多い。そこで我々はこれまで YtvA の光反応ダイナミクスを過渡回折格子 (Transient Grating, TG)法を用いて明らかにしてきた。すでにドメイン単位で切り取ったサンプル YLOV (LOVドメインのみからなるサンプル)と YLOV-linker (LOVドメインに linkerドメインが付随しているサンプル)に加え、全長の YtvA の光反応まで調べたので、現在はその下流分子との相互作用ダイナミクスの検出を行っている。今回の発表では Stressosome を構成する蛋白質群の中でも YtvA と直接相互作用すると予想されている RsbRA を含んだ系での反応を主に報告する。



**【実験】** YtvA と RsbRA をそれぞれ精製し、様々な濃度比で混ぜて YtvA/RsbRA 混合溶液を作製した。この溶液の反応ダイナミクスを、時間分解 TG 法を用いて調べた。比較のために YtvA のみを含む試料を用意し、YtvA/RsbRA 混合溶液と同じ条件で TG 測定を行った。TG 法では、462 nm のパルス光を励起光に、840 nm の連続光をプローブ光として用いた。更に、YtvA と RsbRA の基底状態における分子間相互作用の確認において、TG 法以外にも Cross-linking や静的光散乱、動的光散乱の手法を用いて確認を行った。

**【結果と考察】** 図 2 に YtvA と YtvA/RsbRA 混合溶液の TG 信号を示す。ともに拡散係数変化を示す山型の分子拡散信号が観測され、立ち上がり反応物、減衰が生成物の拡散信号と同定された。YtvA のみの系(図 2 (a))では濃度を下げると山型の信号強度が減少する様子が観測され、詳しい解析の結果、

YtvA は基底状態においてテトラマーとダイマーの平衡が存在し、テトラマーのみが拡散係数変化を伴う反応を起こすことが分かっている。この変化は、結晶解析でも報告されている linker ドメインの回転

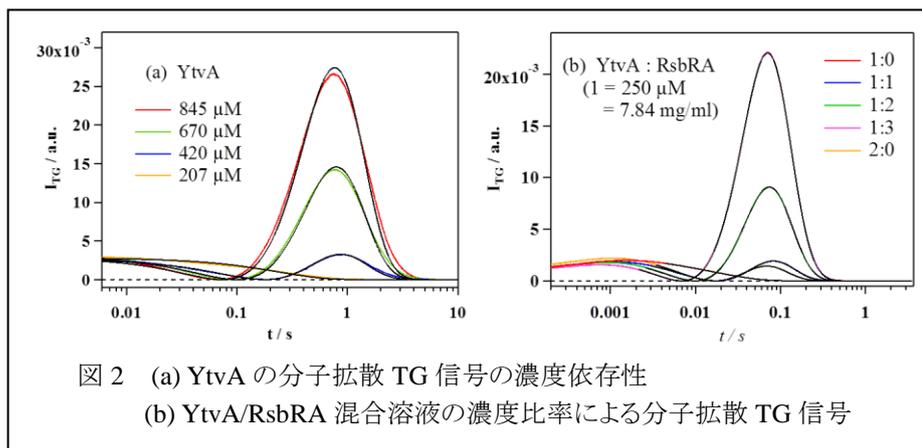


図 2 (a) YtvA の分子拡散 TG 信号の濃度依存性  
(b) YtvA/RsbRA 混合溶液の濃度比率による分子拡散 TG 信号

運動によって引き起こされる分子間相互作用の変化を捉えたものと考察している。また拡散係数変化はダイマーでは観測されずテトラマーのみで観測されたことから、二つのダイマー間で相互作用の変化が起こると予想している。一方、低濃度の YtvA 溶液に RsbRA を徐々に加えて測定した結果を図 2 (b) に示す。低濃度の YtvA 溶液では弱い拡散信号しか観測されないが、RsbRA の濃度を増やすにしたがって拡散信号強度が増えていった。すなわち、RsbRA は光吸収を示さないし YtvA とは異なったタンパク質であるにもかかわらず、YtvA のみで濃度を変えて測定した結果と同じような挙動が観測された。この結果は、YtvA のダイマーと RsbRA のダイマーが基底状態においてヘテロテトラマーを形成し、この分子種が光励起によって拡散係数変化を伴う反応を起こすことを示唆している。静的光散乱測定や Cross-linking 剤を用いた測定でも RsbRA と YtvA との直接の相互作用が観測された。また YLOVlinker 試料に RsbRA を加えても分子拡散信号への影響が全く観測されなかったことから、分子間相互作用には STAS ドメインが重要であることがわかった。

次に反応ダイナミクスに関する考察を行うために、テトラマーが支配的な条件で格子波数を変えて測定を行った(図 3)。YtvA ホモテトラマーの信号と、YtvA/RsbRA ヘテロテトラマーの信号は、測定する時間スケールを変えても非常によく似ていることがわかる。解析の結果、ともに約 60 $\mu$ s の時定数で拡散係数変化を伴う反応を起こし、その後約 470  $\mu$ s で体積膨張を伴う反応が起こることを見出した。以上の結果から、ヘテロテトラマーでもホモテトラマー同様に linker ドメインの回転運動とそれに伴う分子間相互作用の変化が起こり、これによって光シグナルが YtvA から RsbRA へと伝達されると考えられる。RsbRA 自体の構造変化が観測されていないためその活性化機構の考察は難しいが、Stressosome 内では RsbT という蛋白質が STAS ドメイン間に埋め込まれており、ストレス環境下では外部に放出されることが報告されている。

したがって YtvA と RsbRA の相互作用変化がこの解離過程に重要ではないかと考えている。

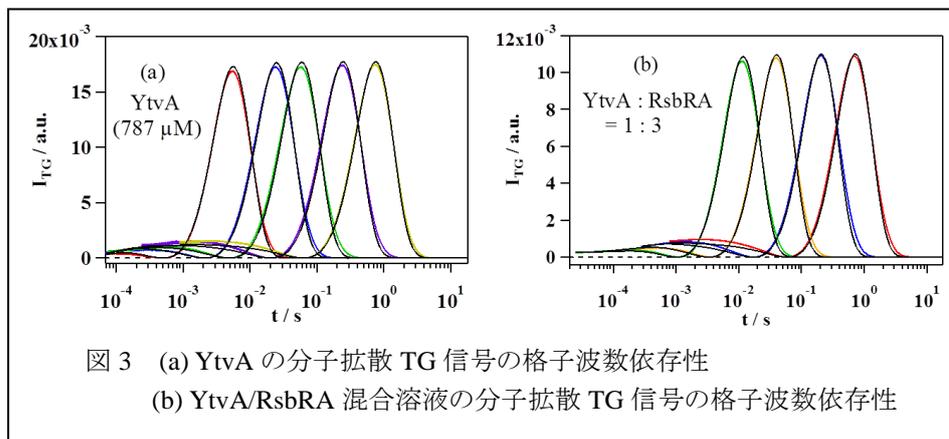


図 3 (a) YtvA の分子拡散 TG 信号の格子波数依存性  
(b) YtvA/RsbRA 混合溶液の分子拡散 TG 信号の格子波数依存性