

光制御転写因子 Aureochrome1 の二量化反応

および DNA との相互作用ダイナミクス

(¹京大院, ²阪大院) ○秋山 祐樹¹, 中曽根 祐介¹, 久富 修², 中谷 陽一², 寺嶋 正秀¹

**Dimerization and DNA binding dynamics of
light dependent transcription factor Aureochrome1**

(¹Kyoto Univ, ²Osaka Univ) ○Yuki Akiyama¹, Yusuke Nakasone¹, Osamu Hisatomi²,
Yoichi nakatani², Masahide Terazima¹

【序】 Aureochrome1 (以下 Aureo) は黄緑藻 *Vaucheria frigida* 由来の光制御転写因子であり、光受容を担う LOV ドメインと、DNA に結合する bZIP ドメインからなる。LOV ドメインはフラビン系の発色団 FMN を有しており、青色光励起によって FMN と LOV ドメイン内部の Cys254 が共有結合を形成し、信号伝達を開始する。bZIP ドメインの認識配列は TGACGT であり、光照射下で DNA との結合力が增大することが示されている[1]。バッファー中では Aureo は分子間ジスルフィド結合によって暗状態・明状態を問わず二量体で存在しており、発色団の反応後、拡散係数変化を伴う構造変化が 140 ms の時定数で起こることを我々のグループは見出している[2]。しかし DNA との結合力に関しては暗状態・明状態間で明確な差を確認できておらず、DNA との相互作用を含めたダイナミクスは明らかにされていない。最近、Aureo は還元剤を加えると暗状態で単量体に平衡が偏ることが報告され、その還元電位の値を考慮すると生体内でも単量体として存在する可能性が示唆された[3]。さらに単量体は光照射により二量化し、DNA へ光依存的に結合することがサイズ排除クロマトグラフィーによって示され、この二量化反応が転写制御に重要な反応だと予想されている。そこで本研究では Aureo の信号伝達機構を明らかにするために過渡回折格子法 (TG 法) を用いて Aureo 単量体の反応ダイナミクスおよび DNA との相互作用ダイナミクスの検出を行った。

【実験】 TG 測定では 465 nm のパルス光を励起光として、840 nm の連続光をプローブ光として用いた。格子波数 (q 値) を変えることで異なる時間領域での分子拡散を観測し、拡散係数変化のダイナミクスを測定した。Aureo の野生体はジスルフィド結合により安定に二量体を形成するため、単量体の反応を調べるのが難しい。そのため本実験では、単量体に平衡を偏らせるために 2 つの Cys 残基 (C162, C182) を Ser に置換した Aureo を用いた。また DNA は 70 塩基対で、認識配列を含むもの (特異) と、含まないもの (非特異) を用意し、3 つのサンプル ((1)Aureo、(2)Aureo + 特異 DNA、(3)Aureo + 非特異 DNA) で TG 測定を行った。

【結果と考察】 1. Aureo の反応ダイナミクス

Aureo (20 μ M) の様々な格子波数における TG 信号を図 1 に示す。熱拡散信号の後に格子波数に依存しない 3.3 ms の時定数を持つ成分が観測され、体積膨張反応に帰属された。遅い時間には

立ち上がりと減衰からなる分子拡散信号が現れ、屈折率変化の符号から立ち上がりが反応物、減衰が生成物の拡散と同定された。つまり拡散係数の減少が光誘起されることがわかり、さらに拡散係数変化の速度がタンパク質濃度の上昇に対して線形に増加したことから、拡散係数の減少は 2 分子間の会合反応によるものだと結論付けられた。会合の速度定数は $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と求められたが、この値は拡散律速反応よりも 5 桁ほど

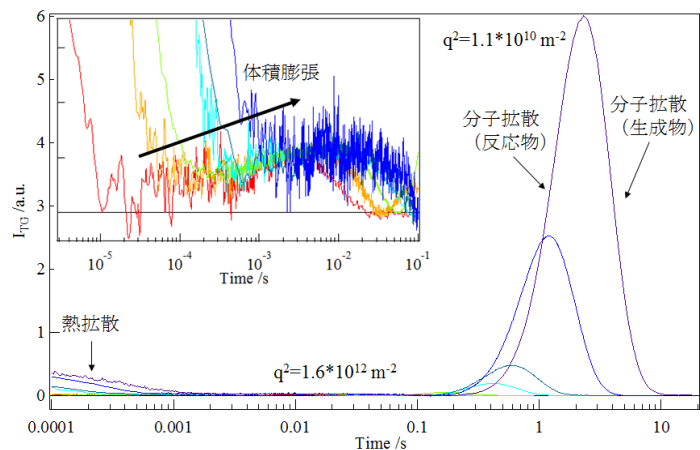


図 1: TG 信号の格子波数依存性

小さい値であり、特定の配向で衝突した分子のみが会合することが理由だと考察している。また、Aureo の LOV ドメインは光依存的に二量化し、その速度定数は $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と報告されている[2]。bZIP ドメインのついた試料と会合速度に大きな差がないことから、DNA の非存在下では二量化に bZIP ドメインが関与していないことが示唆された。

2. DNA との光依存的な結合

図 2 に、特異 DNA 存在下・非存在下での TG 信号の比較を示す。二量化反応が起こる前の時間領域 ($< 50\text{ms}$) では分子拡散信号は一致しているが (図 2 左)、反応が起こっている時間領域 ($> 1 \text{ s}$) の分子拡散信号では、特異 DNA を加えたことによる信号強度の増加とピーク位置のシフトが観察された (図 2 右)。信号の解析により、生成物の拡散係数が DNA を加えたことで小さくなったことがわかり、光依存的に DNA と結合する様子を捉えたものと解釈した。早い時間では TG 信号に変化がないため、Aureo の単量体は光依存的な相互作用をせず、二量化することで初めて相互作用することがわかった。また、非特異 DNA を加えたサンプルでは信号強度の増加は観測されず、非特異配列との結合力は光照射により顕著な変化を示さないことを確認した。

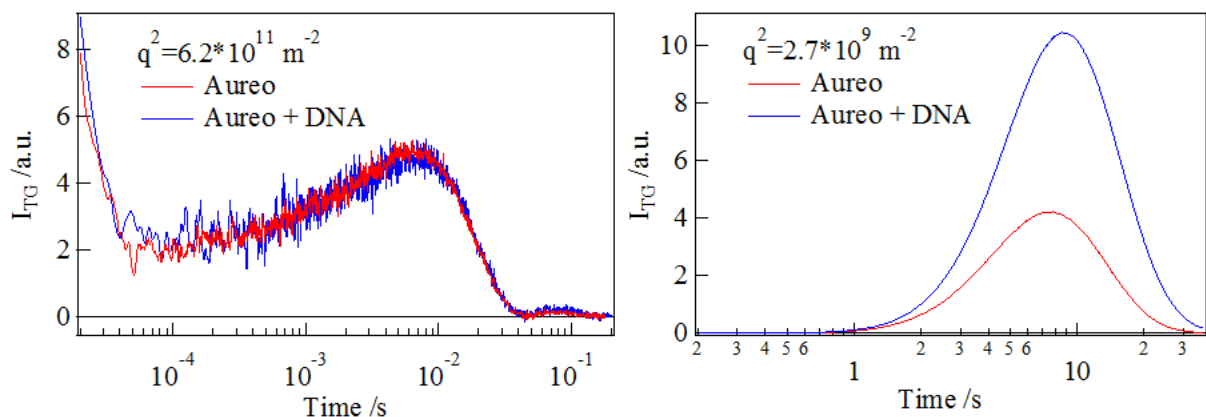


図 2: 特異 DNA 存在下・非存在下で TG 信号の比較

【参考文献】

- [1]Takahashi et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 19625-30
- [2]Toyooka et al. *Biophys J*, 2011, 100, 2801-9
- [3]Hisatomi et al. *J Biol Chem*, 2014, 289, 17379-91