

## 赤色光センサータンパク質 Cph1 の pH 依存的な光反応

(京大院理\*) ○武田公利\*, 寺嶋正秀\*

Study on pH-dependent photoreaction of red light sensor protein Cph1

(Kyoto Univ\*) ○Kimitoshi Takeda\*, Masahide Terazima\*

**【序】** Cyanobacterial Phytochrome (Cph1)は、シアノバクテリア(PCC6803)由来の赤色光センサータンパク質であり、走光性などの制御を行っていると考えられている。Cph1 は N 末端側に光受容ドメイン、C 末端側にキナーゼドメインを持つ。Cph1 は 2 つの安定な光状態(Pr 型、Pfr 型)を持ち、これらは赤色光と近赤外光によって可逆的に切り替わる(図 1)。この Pr⇌Pfr 反応における発色団の反応速度は pH に依存して

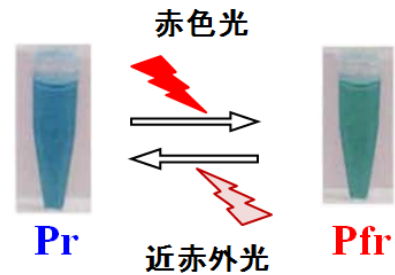


図1. Cph1の光反応

変化することが報告されており[1]、Cph1 は pH センサーとしても機能することが示唆されている。しかし、タンパク質部分の構造変化に対する pH 効果は不明であるため、本研究では、Pr→Pfr 反応への pH 依存性を様々な分光法により詳細に調べ、Cph1 の pH センシング機構の解明を目指した。

**【実験】** 本研究では Cph1 のキナーゼドメインを取り去った変異体(Cph1Δ)の光反応の pH 依存性の測定を行った。Cph1 は Pr 型、Pfr 型ともに二状態存在し、それらの酸解離定数はそれぞれ  $pK_a(\text{Pr})=7.5$ 、 $pK_a(\text{Pfr})=9.2$  である。本研究では Pr 型に関して、どちらか一方の光反応を選択的に検出するために、pH6.5 と pH8.8 のバッファー条件で測定を行った。Cph1 の光反応には多くの中間体が存在する。そこで光反応ダイナミクスの測定には過渡吸収法(TrA 法)、過渡レンズ法(TrL 法)、過渡回折格子法(TG 法)を用いた。TrA 法ではサンプルの吸収スペクトル変化が検出でき、TrL 法ではサンプルの屈折率変化の検出ができる。屈折率変化は吸収変化に加え、励起分子の体積変化にも依存する。したがって、TrA 法と TrL 法の結果を比較することによって、吸収スペクトル変化と体積変化の判別が可能になる。さらに TG 法では屈折率変化に加え、拡散係数変化( $D$  変化)の測定ができるため、タンパク質全体の構造変化のダイナミクスを明らかにできる。

### 【結果】 TrA 法、TrL 法の測定結果

#### pH6.5 における光反応ダイナミクス

図 2、3 に TrA 法、TrL 法で得られた信号を示す。解析の結果、3 成分の反応が観測され、その時定数は両手法で同じであった。このことから、これらの反応は発色団(PCB)周辺で起こっているとわかった。反応の時定数は  $370\mu\text{s}$ 、

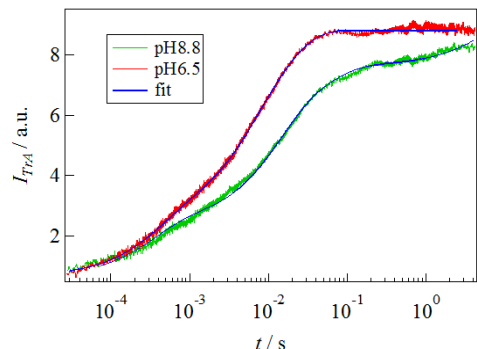


図2.TrA法で得られた信号

5.0ms、15.8ms であった。

### pH8.8 における光反応ダイナミクス

pH8.8 についても同様の測定を行った(図 2、3)。解析の結果、pH8.8 においては4成分の反応が観測されたが、それぞれの時定数は TrA 法, TrL 法を用いた測定で一致したことから、PCB 周辺の変化であることが分かった。その値は 340 $\mu$ s、12.8ms、56ms、7.0s であった。

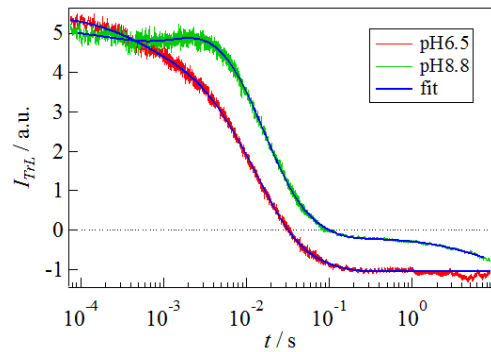


図3. TrL法で得られた信号

### TG 測定の結果

図 4 に pH6.5、pH8.8 の TG 信号を示す。それぞれの測定で拡散係数が変化する様子が観測された。pH6.5 について、格子波数を変えて測定を行い、拡散信号の時間発展を三状態モデルにより解析した結果、*D* 変化の時定数は 5.3ms と 43.4ms であった。また、さらに早い時間でも *D* 変化が起きていることが分かった。これらの時定数は、PCB 周辺で起こる反応の速度と近い値であることから、PCB 周辺の変化によって引き起こされる構造変化であると考えている。

pH8.8 に関しても同様に測定を行った結果、複雑な TG 信号が得られた(図 4 右)。こちらに関しては現在解析中である。

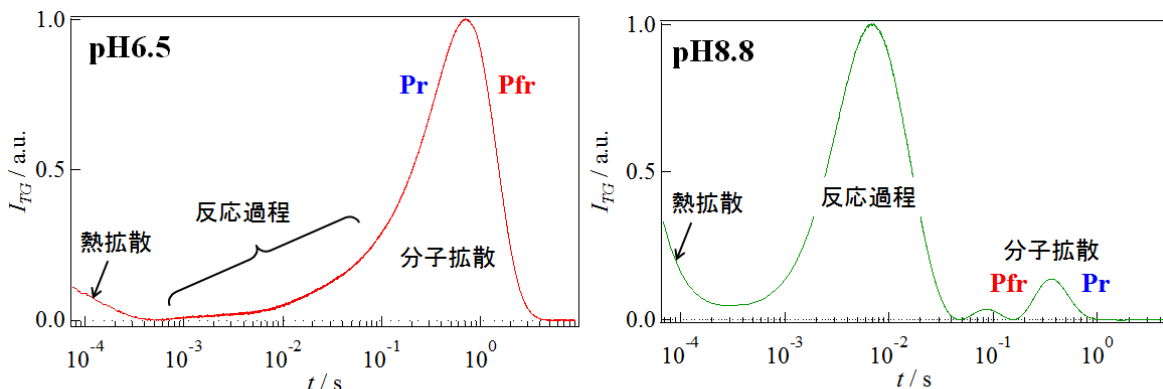


図4. TG法で得られた信号(左:pH6.5、右:pH8.8)

**【考察】** 本研究から Cph1 では、pH 依存的に異なる光反応ダイナミクスをとることが分かった(図 5)。pH6.5 に関しては、PCB 周辺の変化が起き、それにより、タンパク質の構造変化が起きていることが分かった。pH8.8 に関しては、

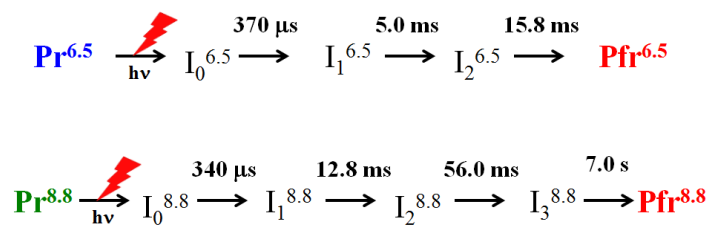


図5. Cph1の発色団周辺のpH依存的な光反応

PCB 周辺の変化のダイナミクスは分かったが、それによるタンパク質の構造変化のダイナミクスに関しては現在解析中である。本討論会では、*D* 変化のダイナミクスを明らかにし、タンパク質の全体構造におけるダイナミクスの違いについても議論する。

[1] van Thor JJ et al. Biochemistry 2001, 40(38): 11460-11471