

青色光センサー全長フォトトロピンの光反応

(京大院理¹、慶應義塾大院工²、大阪府立大院理³) 中曽根祐介¹、岡島公司²、
相原悠介¹、長谷あきら¹、徳富哲³、寺嶋正秀¹

Time-resolved detection of conformational changes of full-length phototropin

(Kyoto Univ.¹, Keio Univ.², Osaka Prefecture Univ.³) Yusuke Nakasone¹, Koji Okajima²,
Yusuke Aihara¹, Akira Nagatani¹, Satoru Tokutomi³, Masahide Terazima¹

【序】フォトトロピンは植物や緑藻由来の青色光センサー蛋白質であり、植物では光屈性や葉緑体の運動を制御し、緑藻においては有性生殖の促進や遺伝子の転写制御を光依存的に行う。その一次構造として N 末端に二つの光受容ドメイン (LOV1, LOV2) を、C 末端に kinase ドメインを持つ (図 1a)。LOV1, LOV2 は構造の類似性が高いが (図 1b, c)、その生理学的役割は大きく異なり、LOV2 ドメインが kinase の活性

制御を主に担う一方、LOV1 は光感度の調節を担うと考えられている。

我々はこれまで、その分子機構を明らかにすべく、単離した LOV ドメインの光反応検出を行ってきた [1]。植物由来のフォトトロピンでは LOV2 ドメインの C 末端に位置

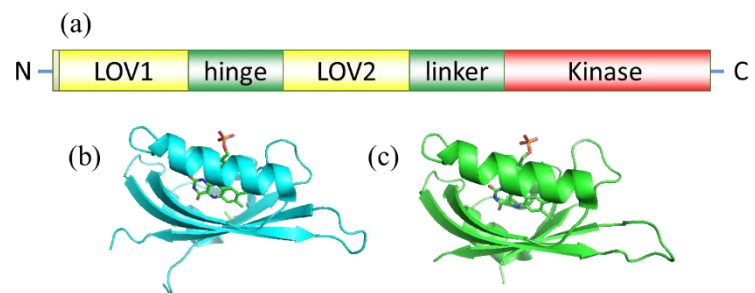


図1 フォトトロピンの一次構造(a)とLOV1(b), LOV2(c)の立体構造

するヘリックスの崩壊過程が光励起後 1 ms で起こり、LOV1 ドメインはその会合状態が光依存的に変化することを明らかにした。これらはそれぞれ kinase ドメインの活性化、光感度の調節に重要な反応と考えられる。一方、緑藻クラミドモナス由来のフォトトロピンでは LOV2 ドメイン周りの構造変化は誘起されず、LOV1 ドメインの C 末端ヘリックスが崩壊するという結果が得られており、生物種間で光受容ドメインの反応に多様性があることを見出してきた。これらの結果を基に kinase の活性化モデルを提唱しているが、全長タンパク質の回収・測定が困難であったため、直接 kinase の活性化反応を時間分解検出できていない。しかし近年、我々は緑藻クラミドモナスおよび緑藻オストレオコッカス由来の全長フォトトロピンの回収に成功したため、本研究ではその反応検出に取り組み、全長タンパク質の光反応を解明することを目指した。

【実験】大腸菌系でクラミドモナス、オストレオコッカス由来の全長フォトトロピンの回収を行った。その際、LOV1 あるいは LOV2 の反応を阻害した変異体 (反応初期過程に必須なシステイン残基をアラニンに置換した C/A ミュータント) や kinase ドメインを切り取った試料の作製も行い、野生型フォトトロピンとの比較を行った。反応検出には主に過渡回折格子 (Transient Grating = TG) 法を用い (励起波長: 465 nm、プローブ波長: 840 nm)、体積変化や拡散係数変化という観

点から分子全体の光反応検出を行った。

【結果】クラミドモナス由来の全長フォトトロピンを光励起して得られた TG 信号を図 2 に示す。発色団近傍の構造変化に起因する信号 (~ 800 ns) と、励起分子から放出された熱の拡散信号が、比較的早い時間スケールで観測された。その後の立ち上がり信号と減衰信号はそれぞれ反応物、生成物の分子拡散信号と同定された (光反応において拡散係数が減少する)。格子波数を変え、拡散信号の時間発展を解析することで、蛋白質全体の構造変化が約 200 ms で起こることがわかった。

また濃度を変えた測定や CD 測定により、タンパク質間のダイマー化反応およびヘリックスの崩壊反応が拡散係数変化の主な要因であることを明らかにした。さらに、LOV1 あるいは LOV2 ドメインの反応を阻害したミュータントで同様の測定を行ったところ、LOV1 の反応を阻害したときのみ、タンパク質全体の反応が抑制されることがわかった。この結果

は、LOV1 が全長タンパク質で観測された拡散係数変化に重要であり、LOV1 の C 末端ヘリックスの崩壊反応が保存されていることを示唆している。さらに kinase ドメインを除いた試料を測定したところ、全長タンパク質に比べて拡散係数の変化量が減少したことから、kinase ドメインも構造変化を起こすことがわかった。

次にオストレオコッカス由来のフォトトロピンの TG 信号を図 3 に示す。共有結合形成、熱拡散、分子拡散信号が観測され、拡散係数変化を伴う反応が光誘起されることが分かった。しかし、LOV1 の反応を阻害しても (C66A ミュータント)、反応への影響は限定的であったことから、オストレオコッカス由来のフォトトロピンでは、LOV2 がその反応を支配的に制御していることがわかった。また linker および kinase を取り除くと、拡散係数変化が観測されなくなることから、linker および kinase 領域で大きな構造変化が光誘起されることも明らかにした。

討論会ではこれらの結果を基に、発色団近傍のわずかな動きがタンパク質全体の構造変化を引き起こし、kinase の活性化に至る過程を議論する。その際、生物種間で光反応に多様性が生じる要因についてもタンパク質構造などを基に考察する。

[1] M. Terazima. *Biochim Biophys Acta*, 1814: 1093, 2011.

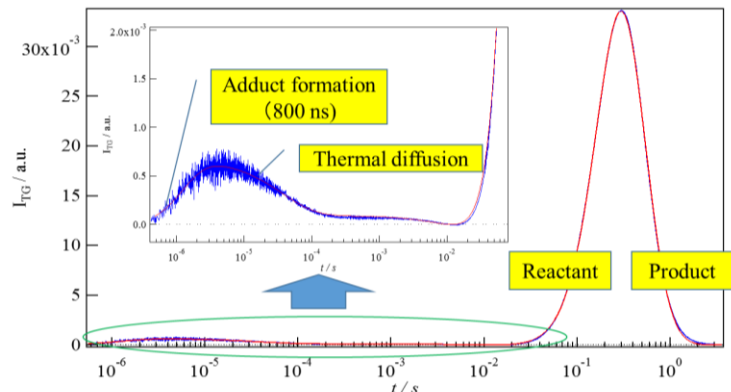


図2 クラミドモナス由来のフォトトロピンのTG信号

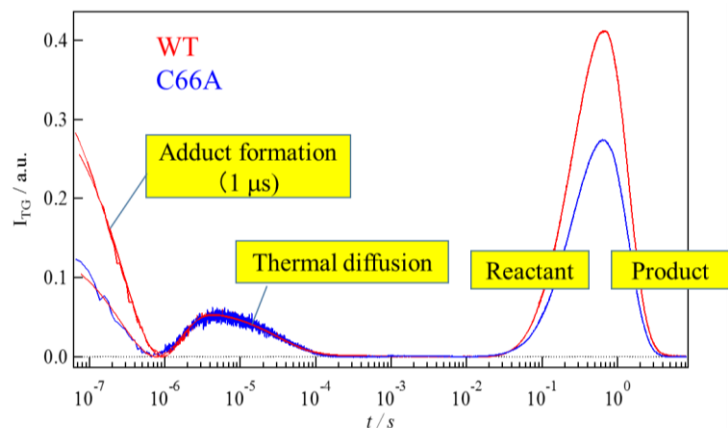


図3 オストレオコッカス由来のフォトトロピンのTG信号