

赤色光センサータンパク質Cph1の 光受容ドメインからキナーゼへの構造変化過程

¹京大院理 ○武田 公利¹, 寺嶋 正秀¹

Signaling pathway from photosensory domain to kinase domain of red light sensor protein Cph1

○Kimitoshi Takeda¹, Masahide Terazima¹ ¹ Department of Chemistry, Kyoto University

【Abstract】 Cph1 is a member of phytochromes which are red and far-red light sensor proteins. It consists of a photosensory domain and a kinase domain. Although it has been reported that a light absorption leads to conformational changes of chromophore and protein part, the reaction dynamics has not been clarified yet. Here, we investigated the photoreaction of full-length Cph1 by using the transient absorption and transient grating methods. We detected four reaction phases as changes of absorption spectrum (time constants are 900 μ s, 11ms, 62ms, 1.1s). At the 900 μ s and 1.1s steps, the diffusion coefficient (D) of Cph1 also significantly changed, representing that the two phases accompanied conformational changes of protein moiety. Since Cph1 forms a dimer in both dark and light states, the D changes have been attributed to the quaternary structure changes in the dimer. We suggest that the photosensory domain moves at the early step (900 μ s), which is followed by a conformational change of the kinase (1.1s). These dynamics should be key steps in the signaling process of Cph1.

【序】 Cph1 はシアノバクテリアが保有する赤色光センサータンパク質であり、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 (Fig.1)。発色団周辺部の構造や光反応については過渡吸収や NMR、ラマン分光を用いた先行研究によって明らかにされている [1, 2, 3]。一方、光情報認識からキナーゼ活性化に至る信号伝達機構は未だ不明な点が多い。この解明にはタンパク質部分の高次構造変化の検出が不可欠であるため、我々は過渡回折格子 (TG) 法を用いてこれに取り組んだ。すでに Cph1 からキナーゼドメインを取り除いた変異体 (Cph1 Δ) の光反応測定を行い、Cph1 Δ が溶液中でダイマーを形成すること、光励起後 1ms 以内に四次構造変化 (ダイマー内での配向変化) を起こすことを前年度の討論会で報告した。本発表ではキナーゼの活性化反応を直接観測するために全長 Cph1 を精製し、その光反応を過渡吸収法および TG 法により検出した結果を報告する。

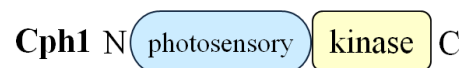


Figure. 1 Primary structure of Cph1

【方法】 過渡吸収法により発色団近傍の反応を、TG 法により発色団の反応に加えてタンパク質全体の反応を調べた。TG 法は光反応に伴う屈折率変化及び拡散係数変化を高感度に検出可能である。特に拡散係数 (D) はタンパク質の高次構造変化を敏感に反映するため、分子全体のダイナミクスを捉えることができる。

過渡吸収測定では励起光に 615nm のパルスレーザー、プローブ光に 720nm の連続光を用いた。TG 測定では励起光に 615nm のパルスレーザー、プローブ光に 840nm の連続光レーザーを用いた。

【結果・考察】 過渡吸収測定の結果、全長 Cph1、Cph1Δともに 4 つの吸収変化成分が検出され(全長 Cph1: 900μs, 11ms, 62ms, 1.1s, Cph1Δ: 260μs, 2.3ms, 11ms, 900ms)、反応速度に多少の差はあるが、光励起による発色団近傍の変化は保存されていると考えられる。

全長 Cph1 と Cph1Δで得られた TG 信号を Fig.2 に示す。2 つの信号を比較したところ、分子拡散信号(> 10ms)に顕著な違いが見られた。この差はキナーゼドメインの有無によって構造変化が大きく変わること示している。そこで全長 Cph1 の分子拡散信号の時間発展を、格子波数を変えて測定した(Fig. 3)。詳細な解析により、全長 Cph1 では 900μs で小さな D の減少が起こり、1.1s でさらに大きな D の減少が起こることが明らかになった(Fig.4)。これらの時定数が過渡吸収測定で得られた時定数と一致したことから、上記 D 変化は発色団の動きと同期して起こることがわかった。

全長 Cph1 は 2 量体を形成することがわかっている。また、我々のこれまでの研究により、Cph1Δでは早い時間(< 1ms)で D が大きく減少する四次構造変化が起こることを明らかにしている。したがって、全長 Cph1 の光励起後 900μs で起こる D の減少は光受容ドメインの四次構造変化(配向変化)に由来していると考えられる(Fig. 4)。一方、1.1s で起こる大きな D 変化は Cph1Δでは観測されていないため、キナーゼドメインの構造変化に同定した。Cph1 の CD 測定では、顕著な二次構造変化は観測されなかったため、 D の減少の要因はキナーゼドメインの四次構造変化(配向変化)と予想している(Fig.4)。

本討論会ではこれらの結果を基に、Cph1 の光受容ドメインからキナーゼへの信号伝達分子機構について議論を行う。

【参考文献】

- [1] van Thor JJ et al. Biochemistry 2001, 40(38): 11460-11471
- [2] Song C et al. Photochem Photobiol. 2013, 89(2): 259-273
- [3] Velazquez Escobar F et al. J Phys Chem B. 2017, 121(1): 47-57

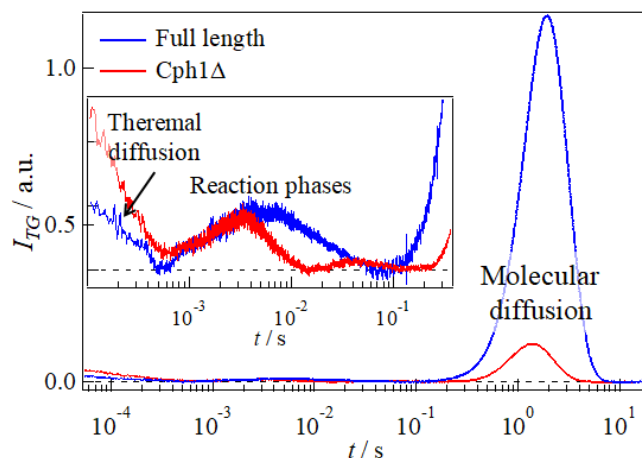


Figure. 2 Typical TG signals of full-length Cph1 and Cph1Δ

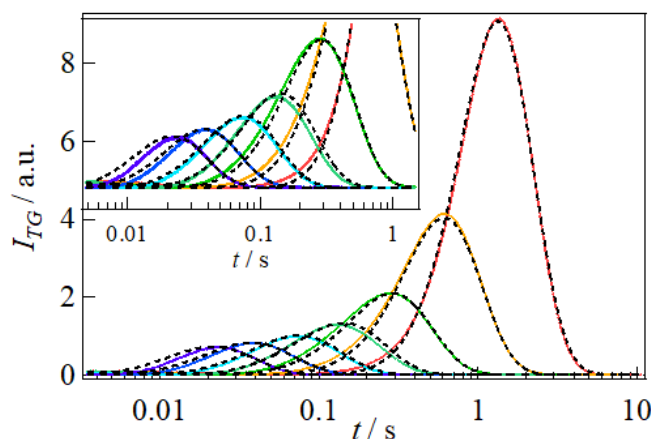


Figure. 3 Time development of the molecular diffusion signal of full-length Cph1. The dotted lines are fitting curves.

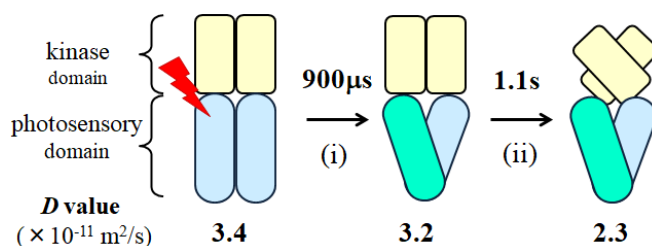


Figure. 4 Reaction scheme of full-length Cph1. (i) The quaternary structure change of photosensory domain occurs in 900μs. (ii) Quaternary structure of kinase domain changes with a time constant of 1.1s.