

青色光受容タンパク質BlrP1の光強度依存性と光反応ダイナミクス

京大院理

○柴田耕生、中曽根祐介、寺嶋正秀

Light intensity dependent photoreaction dynamics of blue light sensor BlrP1

○Kosei Shibata, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima
Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

【Abstract】 BlrP1 is a bacterial blue-light sensor from *Klebsiella pneumoniae*. It consists of an N-terminus BLUF domain (photosensory domain) and a C-terminus EAL domain (enzymatic domain). Upon photoexcitation, the light signal is transmitted from BLUF to EAL through conformational changes of protein part. In order to understand the signal transduction mechanism, we investigated the reaction dynamics of full-length BlrP1 by using the transient grating (TG) method. We found that the BlrP1 is in equilibrium between monomer and dimer in the dark and photoexcitation of the dimer leads to a significant decrease of diffusion coefficient (D), which is attributed to a tertiary/quaternary structural change. Interestingly, the quantum yield of the D -change strongly depends on the excitation pulse energy, suggesting that the structural change takes place only when both monomer units in the dimer are excited. These findings may imply that the BlrP1 works as a light intensity sensor. To test the hypothesis, we are now examining the dependence of light intensity on the enzymatic activity of BlrP1.

【序】 BlrP1 は非光合成細菌 *Klebsiella pneumoniae* の青色光センサーとして発見され、光受容を担う BLUF (sensor of Blue Light Using FAD) ドメインと酵素活性を有する EAL ドメインからなる (Fig.1 に結晶構造 (ダイマー) を示す[1])。光照射下で EAL は細胞内シグナル伝達物質 c-di-GMP を加水分解し、バイオフィルムの形成を阻害する。BLUF は発色団として FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) を持ち、光励起後数ピコ秒で FAD と近傍アミノ酸間の水素結合ネットワークが変化することが過渡吸収測定により報告されている[2],[3]。しかし、その後起こる EAL の構造変化を時間分解で検出した例はない。結晶構造解析や水素/重水素置換質量分析を基に信号伝達経路が議論されているが[4]、分子機構の真の理解にはタンパク質全体の反応を実時間で捉える必要がある。そこで本研究では TG 法を用いて BlrP1 の光反応ダイナミクスを測定し、機能を生み出す高次構造変化を明らかにすることを目指した。

【方法 (実験・理論)】 TG 法は 2 本のパルス光で作った光干渉縞でタンパク質を励起し、その後の反応をプローブ光の回折光として検出する手法である (Fig.2)。TG 信号の時間変化から溶質の拡散係数を決定できるため、拡散係数変化という観点からタンパク質の高次構造変化を時

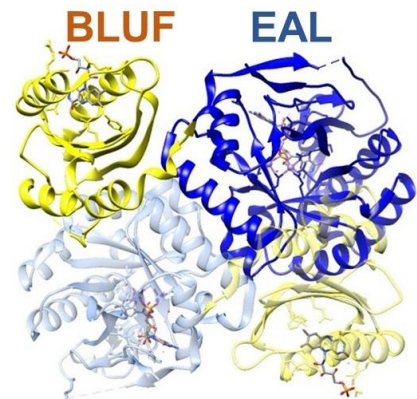


Fig.1: Crystal structure of BlrP1

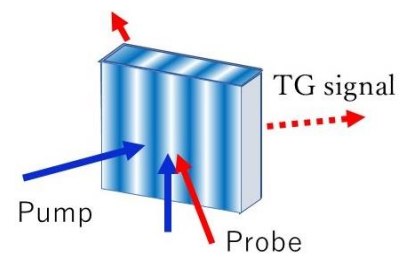


Fig.2: Principle of TG method

間分解検出できる[5]。構造変化を起こすドメインを決定するために、全長 BlrP1 の他に BLUF ドメインのみからなる試料 (BlrP1-BLUF) も用意した。励起光には 462nm のパルスレーザーを、プローブ光には 840nm の CW レーザーを用いた。

【結果・考察】 Fig.3 (Left)に BlrP1-BLUF および全長 BlrP1 を光励起して得られた TG 信号 (分子拡散信号) を示す。BlrP1-BLUF の拡散信号は単調減衰であるのに対して、全長 BlrP1 では立ち上がりと減衰からなる信号が得られた。これは全長 BlrP1 においてのみ顕著な拡散係数変化 (構造変化) が起こっていることを意味しており、発色団周りの局所的な動きが EAL ドメインの構造変化を引き起こしたと解釈される。またタンパク質濃度を変えて測定した結果、BlrP1 はモノマー・ダイマー間の平衡にあり、ダイマーのみが拡散係数変化を起こすことが分かった。

次にダイマーの反応に対する励起光強度依存性を調べた (Fig.3 (Right))。ここでは励起分子数で信号強度を規格化している。それにも関わらず、励起光強度が強いほど拡散信号の強度が増大した。詳細な解析の結果、発色団周りの反応の量子収率は励起光強度によらず一定であるのに対し

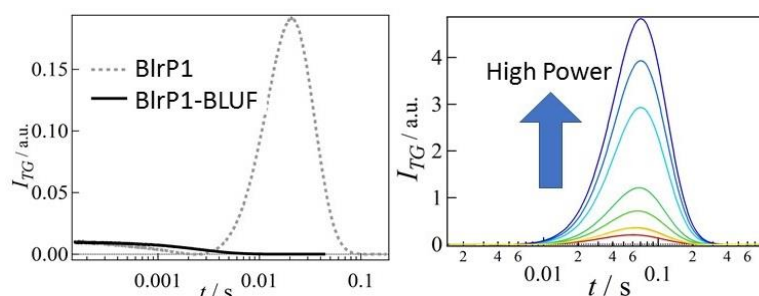


Fig.3: Left; TG signals of BlrP1 and BlrP1-BLUF. Right; TG signal of BlrP1 depends on laser power.

して、拡散係数変化の収率は励起光強度を上げると上昇することを見いだした。このことから、ダイマーの内1つのモノマーが励起されても分子全体の構造変化は起こらず、両方のモノマーユニットが励起されて初めて大きな構造変化を起こすことがわかった。両方のユニットが励起される条件下で TG 信号の時間発展を取得・解析し、構造変化の時定数を 79 s^{-1} と決定した。CD スペクトルは暗・明状態で変化がなかったことから、拡散係数変化の要因は3次・4次構造の変化と考えられる。

本研究により BlrP1 はモノマー・ダイマーの平衡にあり、ダイマーのみが強光下で顕著な構造変化を起こすことを明らかにした (Fig.4)。この結果は BlrP1 が光強度センサーとして機能する可能性を示唆している。現在、この検証および TG 測定により捉えた構造変化の生理的意味を明らかにするために、酵素活性に対する光強度依存性を測定している。本討論会ではこれらの結果も含め、BlrP1 の機能につながる分子反応機構を議論する。

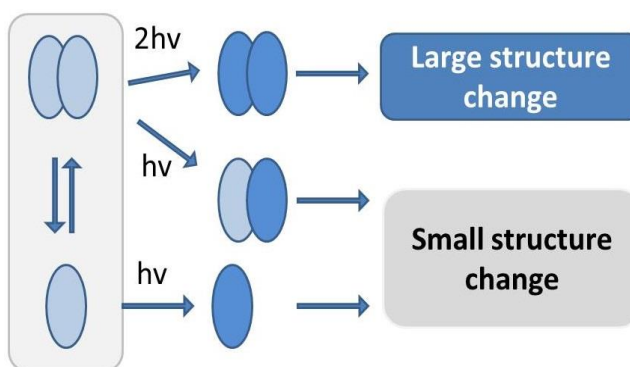


Fig.4: Reaction scheme of BlrP1

【参考文献】

- [1] T. R. M. Barends *et al. Nature* **459**, 1015-1018 (2009)
- [2] S. Anderson *et al. Biochemistry* **44**, 7998-8005 (2005)
- [3] M. Gauden *et al. Biochemistry* **44**, 3653-3662 (2005)
- [4] A. Winkler *et al. J. Mol. Biol.* **426**, 853-868 (2014)
- [5] M. Terazima *Biochimica et Biophysica Acta* **1814** 1093-1105 (2011)