

## 青色光受容タンパク質PYPと下流分子PBPによる 複合体形成ダイナミクスの検出

<sup>1</sup>京大院理, <sup>2</sup>学習院大理, <sup>3</sup>奈良先端大物質

○金穂香<sup>1</sup>, 中曽根祐介<sup>1</sup>, 高門輝<sup>2</sup>, 山崎洋一<sup>3</sup>, 上久保裕生<sup>3</sup>, 寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Complex formation dynamics of blue light sensor protein PYP and its downstream protein PBP

○Suhyang Kim<sup>1</sup>, Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Akira Takakado<sup>2</sup>, Yoichi Yamazaki<sup>3</sup>,  
Hironari Kamikubo<sup>3</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Kyoto University, Japan

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Gakushuin University, Japan

<sup>3</sup> Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Japan

**【Abstract】** PYP is a bacterial blue light sensor protein regulating a negative phototactic response. It contains *p*-coumaric acid as a chromophore[1]. Upon photoexcitation, PYP undergoes a photocyclic reaction that begins with a *trans-cis* isomerization of the chromophore. Though the photochemistry of the chromophore has been studied extensively, the signal transduction mechanism is still under debate to a lack of information on downstream proteins. Recently, however, a partner protein which is called PYP binding protein (PBP) was identified for PYP from *Rhodobacter capsulatus*[2]. In this study, to understand the signaling mechanism, we investigated the reaction dynamics of the complex formation between PYP and PBP using the transient grating (TG) method. In the presence of PBP, a significant decrease of the diffusion coefficient of PYP was observed, representing a formation of the PYP-PBP complex. Analyzing a time development of the diffusion signal, we firstly determined the rate constants of several steps of the complex formation.

**【序】** PYP は紅色細菌の負の走行性に関わる青色光受容タンパク質である。発色団である *p*-クマル酸のトランス-シス異性化を起点として、プロトン移動や構造変化を伴う光反応サイクルを示す[1]。PYP はタンパク質間相互作用を媒介する PAS ドメインの一種であり、そのシグナル伝達機構が注目されているが、直接相互作用する下流分子が同定されていなかったため、信号伝達機構について未知な点が多い。しかし近年、紅色細菌 *Rhodobacter capsulatus* において PYP の下流分子 PBP が同定された[2]。溶液中でダイマー構造をとる PBP は PYP と光依存的に相互作用し、Fig. 1 に示すように多段階に複合体を形成することが小角 X 線散乱測定により予想されている[2] (Fig. 1)。本研究では、分子間の信号伝達機構を速度論的に明らかにするために、拡散係数変化という観点から複合体形成反応を時間分解で検出可能である過渡回折格子法 (TG 法) を用いて PYP と PBP による複合体形成ダイナミクスを検出することを目的とした。

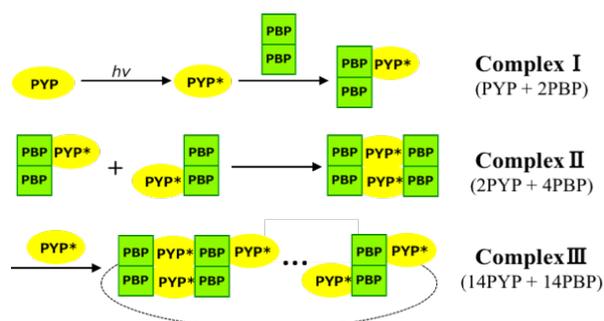


Fig. 1 Model of complex formation

【方法】TG 測定では、励起光として 462 nm のパルスレーザーを、プローブ光として 840 nm の CW レーザーを用いた。複合体形成を PYP の反応から分離するために、PYP のみの試料および PYP と PBP を混合した試料について測定した。

【結果・考察】PYP 単独の試料と PBP を加えた試料の TG 信号を測定し、分子拡散信号を比較したところ (Fig. 2(a))、PBP 共存下でのみ強い山型の信号が観測された。これは光励起によって拡散係数が顕著に変化したことを示しており、複合体形成による分子サイズの変化に帰属できる。

Fig. 2(b)に TG 信号の格子波数依存性を示す。拡散信号の時間発展は、観測している時間スケール (ミリ秒以降) で拡散係数変化 (複合体形成) が起こっていることを示している。2 段階で拡散係数が変化するモデルを用いると信号をよく再現できた。早い反応の速度定数は PBP 濃度に線形に依存したことから PYP と PBP ダイマーの会合反応であると帰属した (複合体 I の形成)。拡散係数の値は PYP 単体では  $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、複合体 I では  $4.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であり、会合反応の速度定数は  $4.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であることがわかった。この拡散係数の変化量は分子サイズの変化から予想されるよりも大きい。CD 測定により光照射前後で顕著な二次構造変化が見られたため、これが要因で拡散係数が大きく減少したと考えられる。

興味深いことに、早い反応の速度は励起光強度に依存しない一方、遅い反応の速度定数は励起光強度を上げるとともに増加した。この結果は遅い反応が励起分子同士の会合反応であることを示しており、複合体 II の形成過程と同定した。解析の結果、複合体 II の拡散係数は  $3.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、励起光強度  $210 \mu\text{J}$  の条件において速度定数は  $2.1 \text{ s}^{-1}$  と求めた。拡散係数の変化量が複合体 II の形成反応として妥当であったことも上記解釈を支持している。Fig. 3 に本研究により明らかになった反応スキームを示す。本討論会では、上記結果を基に PYP と PBP による複合体形成ダイナミクスの詳細について発表する。

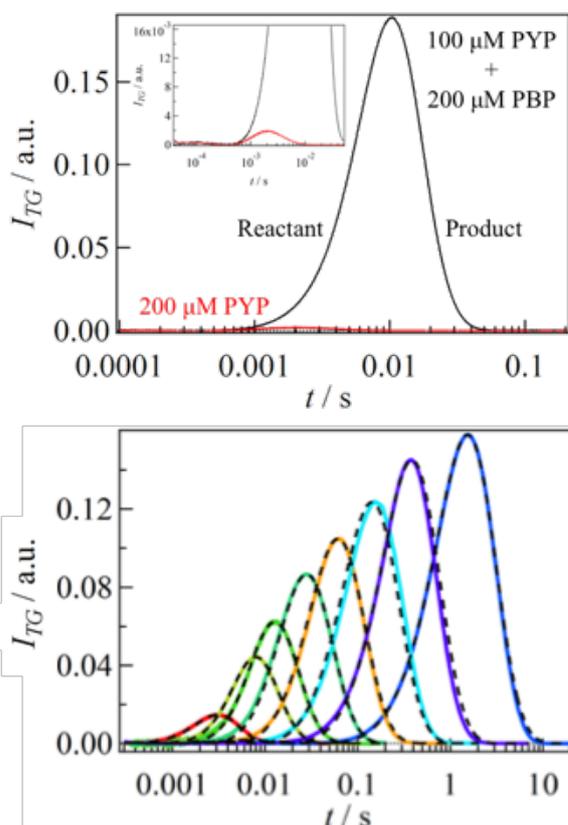


Fig. 2 (a) TG signals of PYP in the absence and presence of PBP. (b) Time development of the molecular diffusion signal of PYP with PBP. The dotted lines are fitting curves.

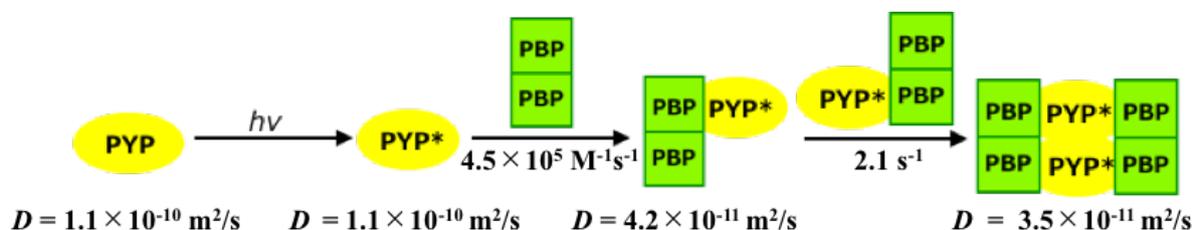


Fig. 3 interaction dynamics between PYP and PBP

### 【参考文献】

- [1] Van Aalten, D. M. F *et al.*, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 64.
- [2] Yamazaki *et al.*, private communication.