

過渡回折格子法で見た Phytochrome A の光反応構造変化

(京大院理、Kumho Lab. Korea*) ○永徳 丈、X. Zarate*、
G.V.Kozhukh*、J.-Il Kim*、P.-S. Song*、寺嶋正秀

【序】Phytochrome は植物に広く認められる水溶性色素蛋白質で、赤・遠赤色の光受容によって 2 状態間を光可逆的に構造変化し(Pr state Pfr state)、植物の成長に対してスイッチを on/off するように調節因子として働く。植物が光のある方向に向かって茎を伸ばしたり(光屈性)体内時計によって花芽形成のタイミングをコントロールする機能に関与していると言われていいる。この Pr state Pfr state の構造変化の過程は、これまで過渡吸収等様々な分光学的アプローチにより調べられてきたが、大きな蛋白質部分に比べ発色団は非常に小さく、観測されているダイナミクスは局所的なものと思われる。そのため、Pr→Pfr によって生物学的な信号がどのような速度で形成されるのか、どのように信号伝達に関係しているかは不明であった。本研究では、蛋白質部分の全体的な構造変化を時間分解で検出可能な過渡回折格子(TG)法を用いて、Pr→Pfr における構造変化の様子を調べた。特に今回は、その体積変化や拡散係数変化に着目した。

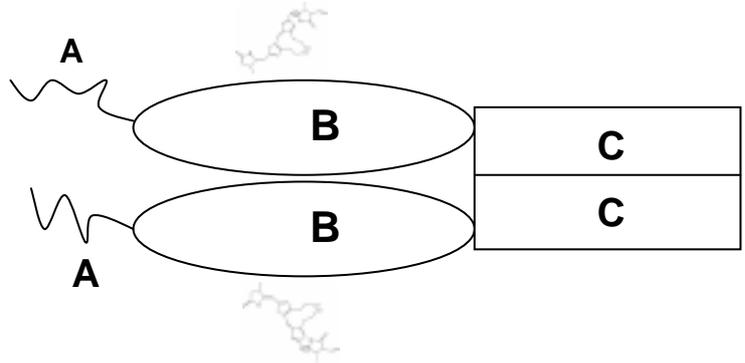


図 1 Phytochrome の模式図

【方法】サンプルは麦から抽出した Phytochrome A(以下 Phy A: 図 1)を用い、その Pr state→Pfr state の反応について調べた。10mM TRIS Buffer 中のこの Phy A (Pr state) を色素レーザー(615nm)で励起し、プローブ光には赤外ダイオードレーザー(840nm)を用い、ホモダイン検出 TG 法で観測した。また、プローブ光の波長をより長波長にするために、赤外ダイオードレーザー(1064nm)を用いたヘテロダイン検出 TG 法も併用した。定常状態(Pr state、Pfr state)にある Phy A の拡散係数は、Sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidy-1,4-azidobenzoate) が光解離し PhyA への付加したものを TG で測定するという手法で見積もった。

【結果と考察】Phy A 溶液を光励起した後に観測されたホモダイン検出 TG 信号を図 2 に示す。信号は装置応答である数 10 ナノ秒で立ち上がった後、さらに立ち上がりと減衰を繰り返し、数 10 ミリ秒の時間スケールで大きな山形の信号を示す。数 10 マイクロ秒の時間で観測される信号の減衰の時定数は、熱の参照試料(マラカイトグリーン水溶液)で見られる信号と同じであり、またグレーティング波数 q に依存して変化することから、これは熱グレーティン

グと同定された。これは、発色団を光励起した光子エネルギーのうち、構造変化として使われなかった余剰エネルギーを、溶媒部分に放出したことにより現れる成分である。遅い時間に見られる強い信号は、 q によって観測される時間が異なり、分子の拡散によるものだと解釈できる。この信号が、立ち上がりと減衰の2つの成分からなるということは、2種類の拡散する成分が存在することを意味する。1つは親分子(Pr state)の拡散で、もう一つは生成物(十分に遅い時間ではPfr state)の拡散であると解釈される。どちらがPrの拡散であるかを調べるため、

Sulfo-HSABを混ぜたPhy A溶液からのTG信号を観測し、それぞれの拡散係数を求めることを試みた。Pfrに対してはIRダイオードレーザー(840nm)、Prに対してはHe-Neレーザー(633nm)をプローブ光に用いるという方法で、両者からのTG信号を観測することに成功した。この結果、Prの拡散係数として $1.48 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、Pfrは $3.01 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ という値が得られた。これらの値を考えると、観測された信号のうち、立ち上がり部分がPfr、減衰部分がPrの拡散を表していると同定することができる。興味深いことに、分子種の拡散による信号の強度と熱拡散による信号の強度を比べると、 q が大きい(格子間隔が小さい)条件では、熱グレーティング信号強度に比べて分子拡散を表す信号が相対的に小さくなる様子が観測された。格子間隔を変えても放出される熱エネルギーは変わらないので、このことは分子種の拡散の信号強度に q 依存性があるということを示している。この拡散を表す信号の強度は、2つの蛋白質の拡散係数の差に関係し、差が大きいほど強くなる。よって、 q が大きくて観測時間が早いと信号強度が小さいということは、拡散係数の変化が小さいことに対応する。即ち、この観測時間内で(見かけの)拡散係数が変化していることを示していると考えられる。この変化速度より、構造変化ダイナミクスに対する知見が得られるはずで、現在その解析を行いつつある。

【文献】

1) Chian-Fan Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, **114**, 4569-4580

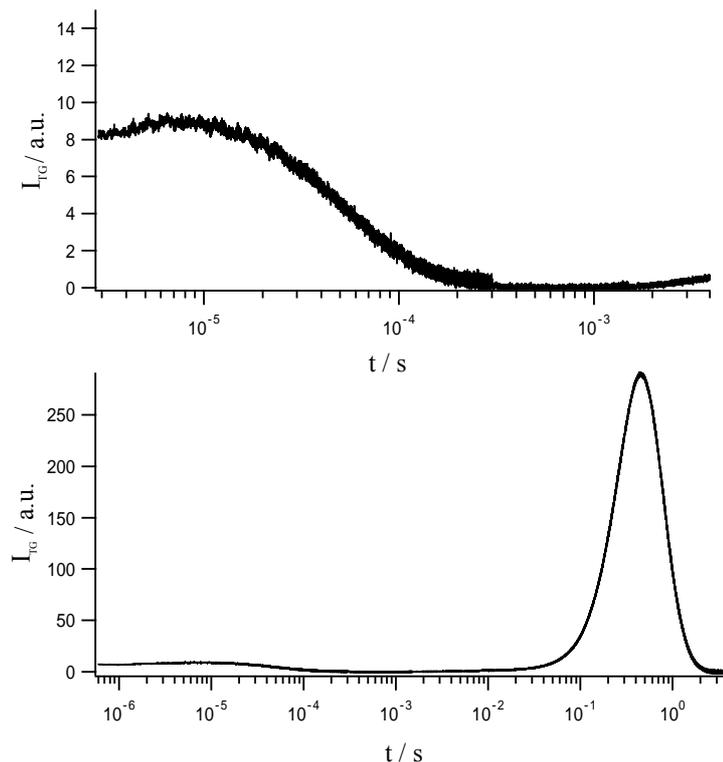


図2 過渡回折格子信号(早い時間スケール(上)と全体信号(下))