

2A07 拡散係数変化から見た Phytochrome の光反応構造変化

(京大院理化¹・KumhoL&E.Lab.Korea²)

○永徳 丈¹, Xristo Zarate², Gennady V. Kozhukh², Jeong-II Kim², Pill-Soo Song², 寺嶋 正秀¹

【序】 Phytochrome は植物に広く認められる水溶性色素蛋白質であり、赤・遠赤色の光受容によって Pr・Pfr と呼ばれる 2 状態間をフォトクロミックに構造変化し、植物の形態形成に関するスイッチを on/off する調整因子として働く。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る。Phytochrome の模式図を図 1 に示したが、分子量 12 万 kDa の単量体が二量体を形成しており、I B・II B に開環テトラピロール状の発色団 Phytochromobilin が結合している。この Pr 状態 ⇌ Pfr 状態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、発色団は蛋白質部分に比べて非常に小さい為に、観測されているダイナミクスは分子全体から見ると局所的なものであった。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、分子内でどのような信号伝達がなされるのかは不明であった。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法（TG 法）を用いて、Pr → Pfr における構造変化の様子を調べ、構造変化に伴って劇的に変わる拡散係数変化の様子に着目し、拡散係数の時間変化についてモデルを立てて考察した。

【方法】 サンプルは麦から抽出した Phytochrome A (以下 PhyA) を用い、その Pr 状態 → Pfr 状態の変化について調べた。10 mM Tris Buffer 中の PhyA (Pr 状態) を常温下で色素レーザー (610 nm) で励起し、プローブ光には赤外ダイオードレーザー (840 nm) を用い、ホモダイン検出 TG 法で観測した。Pr 状態、Pfr 状態での PhyA の拡散係数を見積もるために、Sulfo-HSAB (N-Hydroxysulfosuccinimidyl-1,4, azidobenzoate) を光解離させて PhyA に付加させ、TG で測定するという手法を補助的に用いた。

【結果と考察】 PhyA 溶液を光励起した後に観測される 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、熱の参考試料（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 に依存していることから、これは熱グレーティング信号と同定された。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つ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信号である。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 状態) の拡散で、もう一つは生成物 (十分に遅

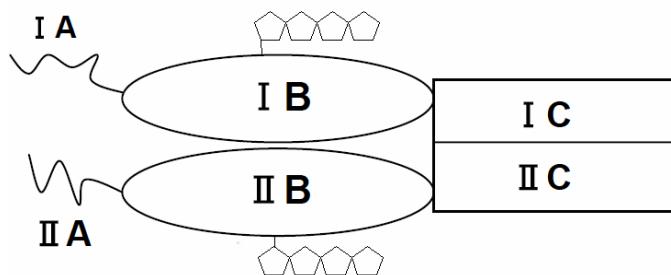


図 1 Phytochrome の模式図

い時間では Pfr 状態) の拡散であると解釈される。立ち上がりと減衰のどちらが親分子/生成物であるかの決定には、Sulfo-HSAB を光付加させて拡散係数を調べる方法を併用し、立ち上がりが生成物、減衰が親分子であると同定した。十分に遅い時間 (1 秒以降) では

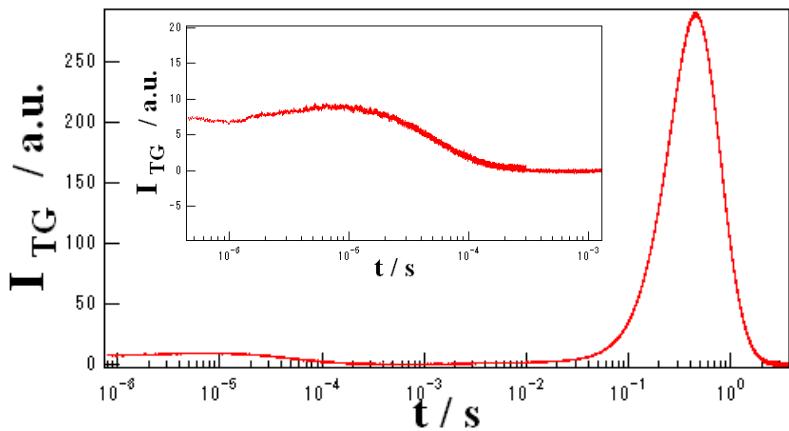


図 2 Phytochrome の TG 信号

信号は 2 つの指数関数で再現することができ、この速度定数と格子波数 q により Pr 状態、Pfr 状態の拡散係数はそれぞれ、 $1.82 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $4.52 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ であることがわかった。同じ分子にもかかわらず拡散定数がこれほど大きく変化することは特異であり、Pr と Pfr の変化に伴って非常に大きい構造変化が起こっていることを示す。CD の測定により、Pr から Pfr へ移ることで α -helix が形成されていくことが報告されており⁽¹⁾、溶媒との相互作用が減る様子が拡散係数変化として観測されていると解釈することができる。1 秒以内の信号は、2 つの指数関数では再現することはできず、これは観測している時間領域において構造変化が起こっており、拡散係数が時間に依存していることを意味する。この信号を解釈する為に Pr と Pfr の構造間を 2 状態的に遷移するモデルに基づいて TG 信号を表す式を求めフィットを試みたが、種々の q における信号を統一的に再現することはできなかった。そこで Pr と Pfr の間にもう 1 つの中間体があると考え 3 状態モデルで解析を行った。結果、この構造変化は約 30ms の寿命を持つ最初の変化と、その後に続く約 0.8 s の寿命を持つ変化という 2 つのステップを経ていることがわかった。時間分解 CD の報告⁽²⁾と照らし合わせて考えると、最初の変化で α -helix が形成され、次の変化は 2 次構造をさほど変えずに 3 次構造を変えるような構造変化が起こっていると解釈される。今後、いくつかの変異種を調べることにより、蛋白質のどの部分がどの寿命で構造変化していくか、といった分子内信号伝達についての知見が得られるであろう。

	$\text{Pr} \xrightarrow{\text{h}\nu} \text{I}_A \xrightarrow{\sim 30\text{ms}} \text{I}_B \xrightarrow{\sim 0.8\text{s}} \text{Pfr}$	(at R.T)
拡散係数	1.82×10^{-11}	1.82×10^{-11}
<u>拡散係数変化から見た反応スキーム</u>		

また、構造変化に使われなかつた余剰エネルギーが溶媒に放出される過程を観測することにより、構造変化に伴うエンタルピー変化を求めることができ、PhyA の場合、 $\Delta H = 150 \text{ kJ/mol}$ であることがわかった。現在、この ΔH の温度依存性を調べることにより、熱容量変化を求める試みをしている。

【参考文献】(1) Lily Deforce et. al. Biochemistry 33, 4918–4922, (1994)

(2) Eefei Chen et. al. J. Am. Chem. Soc. 115, 9854–9855, (1993)