

3P160 過渡回折格子法でみる青色光受容蛋白質 Cryptochrome の光反応

(京大院理化1・Universite Paris VI, France 2)

○ 白石 千晶¹, 永徳 丈¹, Margaret Ahmad², 寺嶋 正秀¹

【序】Cryptochrome は、青色の光を受けて胚軸の伸長を抑制したり、子葉を展開するといった光形態形成を制御する光受容蛋白質であり、分子量 75 kDa の水溶性蛋白質である。その構造は、C 末端ドメインと N 末端ドメインの二つの領域を持ち、紫外線照射による損傷を受けた DNA を修復する photolyase と大きな相同性を持つ N 末端ドメインの構造は明らかになっているが (Fig1)、植物生理学的に重要と言われている C 末端ドメインの構造は未だ不明である。光受容のために、N 末端ドメインに FAD とプテリンという 2 つの光を吸収する発色団をもつ (Fig2)。プテリンは、光エネルギーをより効率よく受容するアンテナの働きをし、吸収したエネルギーは基底状態にある FAD に移動し FAD を励起させる。FAD が励起されると、FAD から Trp に、Trp から Tyr に分子内電子移動が起こるといふモデルが過渡吸収測定により報告されている。このように発色団近傍の局所的な変化の研究はなされているが、光形態形成等の機能のうえで重要な蛋白質全体のグローバルな変化については全く知見が得られていない。そこで本研究では、過渡回折格子法 (TG 法) を用いて、Cryptochrome の分子内電子移動を伴う光反応における蛋白質部分の構造変化を調べた。

【実験】本研究では *Arabidopsis thaliana* から得た cryptochrome-1 (Atcry1) を用いた。サンプルは pH7.5・50mM Tris Buffer、0.5M の NaCl、50% (v/v) glycerol 中の 5 μM の Atcry1 を用い、12°C に保ちながらホモダイナミクス過渡回折格子法 (TG) 法で測定した。測定には励起光として光強度 1 μJ 以下の YAG レーザー三倍波 (355nm) を用いた。また、過渡分子が吸光度を持たない 780nm の光をプローブとして用いた。さらに、FAD 水溶液に対しても同様の実験を行い Atcry1 の TG 信号解析の参考とした。

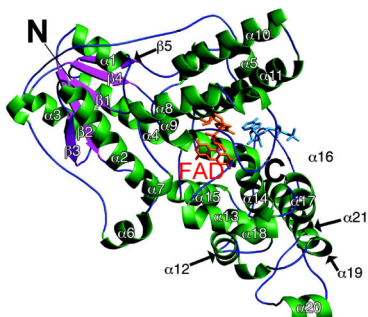


Fig1. N 末端ドメインの構造

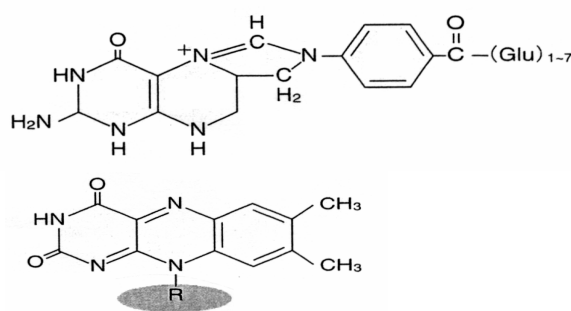


Fig2. 発色団の構造 (上: プテリン, 下: FAD)

【結果と考察】Atcry1 溶液を光励起した後観測される TG 信号を Fig. 3, 4 に示す。信号は数 μs で立ち上がった後減衰し、数 100ms の時間スケールで大きな山形の信号を示す。数 μs の時間で観測される信号の立ちあがりの時定数は 1.2 μs であった。この立ち上がりは水溶液中での FAD の三重項状態の寿命が 2.3 μs と近いことより、Atcry1 でも同様に三重項に励起された FAD から Trp に分子内電子移動が起こり FADH ラジカルと Trp ラジカルが生成される反応が検出されたと考えられる。次に、数 μs の時間で観測された減衰信号は、光子エネ

ルギーを熱エネルギーに変える参照試料で見られる信号と同じであり、また時定数が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、構造変化に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信号である。さらに、1 ms の時定数を持つ成分が観測され、過渡吸収測定による結果 0.91 ms とほぼ一致する事から、Trp ラジカルから Tyr に分子内電子移動が起こり、Tyr ラジカルが生成する反応であると考えられる。

数 100ms の時間スケールで見られる山型の信号は、その時定数がグレーティング波数 q に依存する事から分子並進拡散によるものと解釈できる。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、光反応前後で拡散係数の異なる 2 種類の分子種が存在することを意味する。解析の結果、立ち上がりが親分子、減衰が生成物の拡散によるものであると同定した。速度定数 k と拡散係数 D の関係式 $k=Dq^2$ により親分子、生成物の拡散係数はそれぞれ、 $4.6 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $3.3 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ と求められた。サンプルは 50% (v/v) glycerol を含み 12°C で測定を行っているため、粘性が非常に高い。拡散係数の値について他の蛋白質との比較を容易にするために、Stokes-Einstein の関係式に従って、常温・水溶媒下での拡散係数に換算すると、それぞれ $6.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ 、 $4.9 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ が得られた。Atry 1 の分子量は 75 kDa であり、分子の大きさから考えると親分子の拡散係数 $6.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ は妥当な値である。驚くべきは、光反応の結果その生成物の拡散係数が非常に小さくなった事である。この要因として以下の二つあげられる。

- (1) 分子内電子移動に伴って非常に大きい構造変化が起こった。
- (2) 光照射によりアグリゲーションが起こった。

Cry は *in vivo* 中で、C 末端ドメインが光形態形成を負に制御する因子である COP1 と結合しており、青色光受容によって C 末端ドメインの構造が変化し COP1 との結合が切れ、抑制されていた光形態形成を発現させると考えられている。このことは (1) と一致する。従って、青色光受容により体積を大きくする方向に C 末端ドメインの構造が変化し、さらに溶媒との相互作用が増加したために拡散係数が大きく減少したと解釈することができる。しかし、拡散係数で 10 倍もの違いが、これだけで説明できるかどうかは不明であり、光誘起によって構造が変わり凝集体が生成したという可能性も捨てきれない。これを確かめるため濃度依存性の実験を行い、今後検討する予定である。

過渡吸収測定結果によると、励起された FAD は 100ms で元に戻る。しかし、TG 測定では 100ms ~ 数 s においてこの戻り反応は観測されなかった。これは過渡吸収測定で得られた 100ms では戻り反応は完了しない事を示す。従って、発色団の吸収が元に戻っても、変化した構造は、蛋白質中の塩橋や水素結合などにより安定化されたために、元の状態に戻っていないと考えられる。現在その新たな反応スキームについて検討中である。

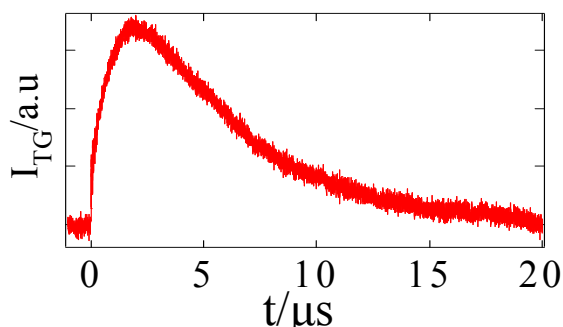


Fig.3 早い時間の TG 信号

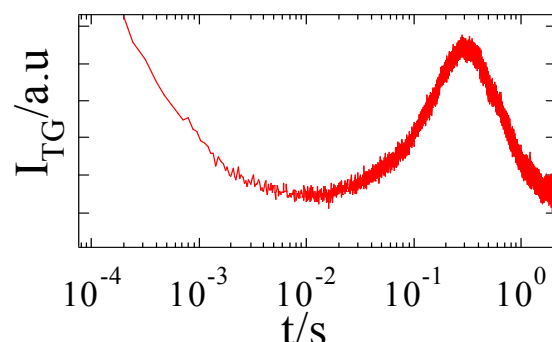


Fig.4 遅い時間の TG 信号