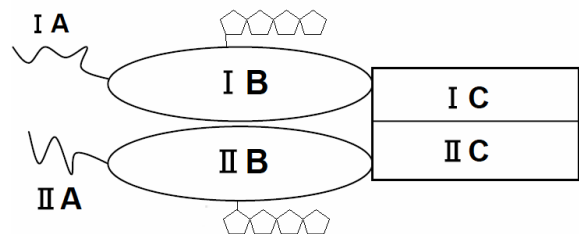


4A07 植物赤色光センサー-Phytochrome の光反応構造変化

(京大院理化¹・KumhoL&E.Lab.Korea²)

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

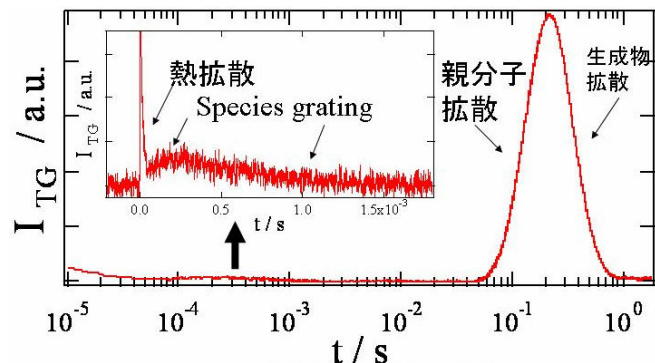
【序】 Phytochrome は植物に広く認められる水溶性色素蛋白質であり、赤・遠赤色の光受容によって Pr・Pfr と呼ばれる 2 状態間をフォトクロミックに構造変化し、植物の形態形成に関するスイッチを on/off する調整因子として働く。植物が光のある方向に向かって茎を伸ばしたり (光屈性)、体内時計によって花芽形成のタイミングをコントロールする機能に関与していると言われていいる。Phytochrome は (図 1) に示すように、分子量 12 万 kDa の単量体が二量体を形成しており、I B・II B に開環テトラピロール状の発色団 Phytychromobilin が結合している。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いるが、その報告はまちまちであり、構造変化スキームが未だに不明なまま最近ほとんど進展していない。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依然不明なままである。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、これまでに本討論会で報告した内容を踏まえた上で、新たな構造変化スキームを提案する。



(図 1) Phytochrome の模式図

【方法】 サンプルは麦から抽出した PhytochromeA (以下 PhyA) を用い、その Pr 状態→Pfr 状態の変化について調べた。10mM Tris Buffer 中の PhyA (Pr 状態) を温度制御下で色素レーザー (610nm) 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。信号の各成分の同定の為に、ヘテロダイン TG 法を補助的に用いた。

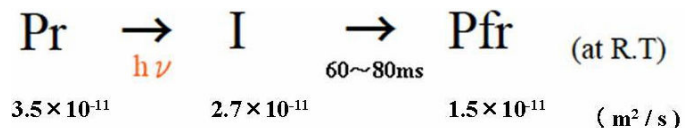
【結果と考察】 PhyA 溶液を光励起した後観測される TG 信号を (図 2) に示す。数 10 マイクロ秒で減衰・立ち上がり、その後数ミリ秒で減衰したのち、200 ミリ秒付近をピークとする大きな山形の信号が見られた。この信号は、数 10 マイクロ秒での減衰が熱グレーティング成分、数 10 マイクロ秒での立ち上がりと数ミリ秒での減衰が speciesグレーティング成分 (過渡吸収分光による



(図 2) 観測された TG 信号

報告とほぼ一致することから population グレーティング成分が支配的と思われる) 200 ミリ秒付近をピークとする大きい山形の信号が、グレーティング波数 q 依存性より分子拡散成分 (立ち上がりが反応物・減衰が生成物) であると同定された。

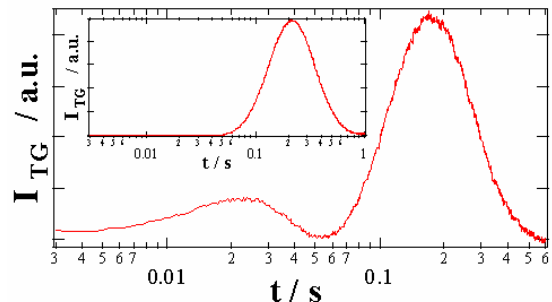
昨年度本学会ではこの拡散係数に着目し、光励起構造変化に伴って拡散係数がどのように変わるかという点について報告



(図 3) 拡散係数変化から見た構造変化スキーム

した。非平衡系における拡散係数変化の記述は他の研究例と同様に2状態的に変化するモデルを用い、それに従って解析したところ、(図3)に示すように段階的に変化していくという結果が得られた。2段階目の変化における時定数60~80ms程度の変化については時間分解CD測定による研究で報告されているものとはほぼ同じであり、PhytochromeのN末端(図1のIA、IIA)における α helix形成と同定されているものである。 α helix形成に伴って拡散係数が大きく減少するという傾向は、他の研究例⁽¹⁾とは異なるものであるが、おそらく蛋白質部分が3次構造的にストローク半径が大きくなる方向へと変化している為であろうと考えられる。(実際に小角X線散乱の実験よりPhytochromeでは分子の形がelongateしているというモデルが提案されている⁽²⁾。)

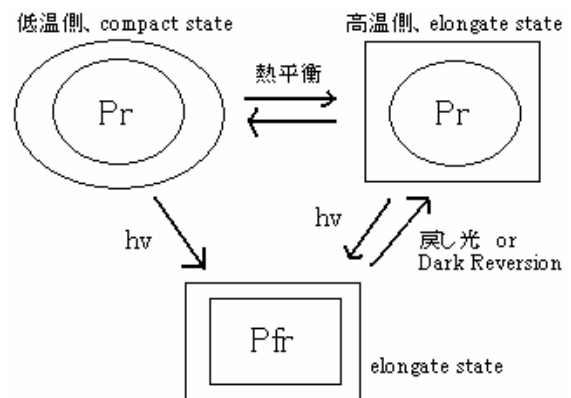
(図2)に示したものは実験開始直後(<6h)の常温下での結果であるが、実験を長時間続ける、或いは比較的高い温度(25°C)で実験していると、TG信号の形が(図4)のように変化していく様子が得られ、検証の結果これがPhytochromeの性質の1つであることがわかった。さらに、Phytochromeに633nmHe-Neレーザーを15分照射し、780nmダイオードレーザーを20分照射した



(図4) TG信号の変化の様子(inset:変化前)

結果、2つのレーザーを照射する前後では吸収スペクトルがほぼ同じであるにも関わらず、TG信号で見ると分子拡散による山状の信号の強度が著しく減少する様子が観測された。吸収スペクトルで検出されるものは発色団近傍の電子状態であり、TG信号の分子拡散の成分は蛋白質部分の構造を強く反映するものである。従って、発色団部分はPr状態だが蛋白質部分はPfr状態である、という状態が存在することが強く示唆される。本研究では温度を10°C~25°C程度に調整して様々な条件で実験を行ったが、温度に対して非常に敏感に蛋白質部分の構造が変化していることがTG信号より確認された。これまでに、吸収スペクトルが温度に依存して僅かに変わるという報告があり、Pr状態と言われていた状態が実際には2つの状態の熱平衡状態であると論じられている⁽³⁾が、本研究は類似のことが蛋白質部分についても言えるということを示唆するものである。

以上の結果をもとに、考えられるPhytochromeの構造変化スキームを(図5)に示す。Braslavskyらが過渡吸収スペクトルの結果に基づいて2種類のPr状態(Pr₆₇₂、Pr₆₅₇)からの平行なスキームを提案している⁽³⁾がそれとの対応については今後検討する予定である。



【参考文献】

- (1) Shinpei Nishida et.al. Biophysical J., 2004, 87, 2663
- (2) Masayoshi Nakasako et.al. FEBS J., 2005, 272, 603
- (3) Aba Losi et.al. Phys.Chem.Chem.Phys., 2003, 5, 2739

(図5) 内側の丸・四角は発色団を表し、外側は蛋白質部分を表す。