

2A12

青色光センサー蛋白質フォトリロピンのドメイン間相互作用変化

(京大院理¹、大阪府大院理²) 中曽根 祐介¹、永徳 丈¹、松岡 大介²、
徳富 哲²、寺嶋 正秀¹

【序】生命は、その活動や成長のために、周りの環境を感知するセンサーを持っている。青色光受容蛋白質であるフォトリロピンはその一例であり、近年その反応機構が多くの興味を集めている。フォトリロピンが光を受けると、蛋白質内でシグナル伝達が行われキナーゼが活性化すると考えられているが、その反応機構に関しては未だ明らかにされていない。こうした光センサーのように外部情報を下流へと伝達する蛋白質の本質を理解するためには、発色団近傍のみならず溶液中での蛋白質全体の構造変化や、分子内あるいは分子間のシグナル伝達過程を時間分解で検出することが、必要不可欠であるにもかかわらず、こうしたダイナミクスを時間分解で直接捉える手法が欠如していることが研究上で大きな問題となっている。例えば、比較的小さい分子の光誘起の解離反応やダイマー化反応などは、過渡吸収測定などにより詳細に研究されてきたが、蛋白質のように複雑で大きい分子では分子会合状態が変化しても吸収は変化しないことが多いために、従来の手法は無効となる。ここでは、蛋白質分子が溶液中を拡散していく過程に注目し、過渡回折格子法 (Transient Grating method = TG 法) によりその時間変化を捉えることで蛋白質の過渡的な体積変化・蛋白質-溶媒間相互作用の変化・凝集反応等に関する検出を行った[1]。特に、フォトリロピン群に共通して存在し、分子間・ドメイン間でのシグナル伝達を担う光受容ドメイン『LOVドメイン』に注目し、その反応ダイナミクスを明らかにすることで、このドメインの働く原理・分子機構を解明することを目的とした。

【実験】フォトリロピンの構造は光受容を担う二つの LOV ドメイン (LOV1、LOV2) と、活性化反応を示す Ser/Thr キナーゼドメイン、さらに LOV2 とキナーゼを結ぶ linker から構成されている。シロイヌナズナの LOV2 ドメイン単体 (LOV2 試料) とそれに linker を付随させたもの (LOV2-linker 試料) (図 1) を用いて、その光誘起反応を時間分解 TG 測定により研究した。

【結果】波長 465nm のパルス光で励起した後の TG 信号を図 2 に示す。それぞれの試料で発色団近傍の構造変化に起因する吸収スペクトル変化による信号 ($\sim 2\mu\text{s}$) と、励起分子から放出された熱の拡散信号が、比較的早い時間スケール ($\sim 100\mu\text{s}$) で観測された。その後の信号は、減衰時定数に格子波数 q 依存性がみられたことから蛋白質分子が溶液中を拡散していく過程を反映した信号であると同定される。興味深いことにこの拡散信号の形や強度が時間変化することが見出された。この分子拡散信号は光励起により得られる生成物の拡散係数を情報として含んでおり、その形や強度に時間変化が観測され

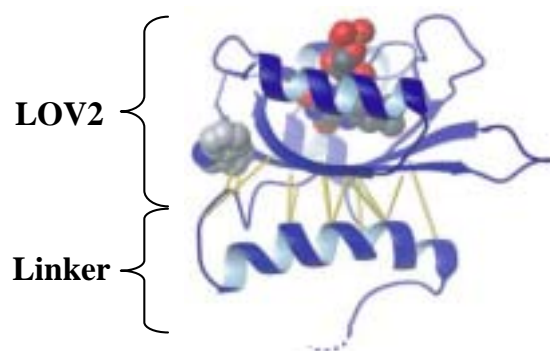


図1 LOV2ドメインとLinker部分の3次構造 (Harper et al. Science. 2003)

たことは、拡散係数変化を伴う蛋白質全体の構造変化が光照射によって誘起されていることを意味している。両方の試料でこの拡散係数変化が観測されたが、その特徴には大きな違いが見られた。まず LOV2 試料では拡散係数変化を伴う反応の速度が蛋白質濃度を下げるに従い遅くなる様子が検出された（濃度 200 μM 40 μM により時定数 10ms 50ms）。このことから、観測された反応は多分子反応であると示唆され、解析の結果、凝集反応（ダイマー化反応）が光誘起されていることが明らかになった。また興味深いことに、高濃度試料では暗状態でもダイマーが溶液中で形成され、光励起によって解離しモノマーになる様子が観測された（時定数 $\sim 300 \mu\text{s}$ ）。これらの結果からドメイン間の相互作用変化が光反応において重要な役割を持っていることがわかる。こうした吸収変化として検出できない会合状態変化を、時間分解で捉えることができたことは、この手法が蛋白質反応研究に非常に有力である事を示している。

一方、LOV2-linker 試料ではダイマー・モノマー間での解離・結合反応は観測されなかったが、LOV2 試料に比べてより大きな拡散係数変化が光励起後 1ms の時定数で観測された。

CD測定の結果とあわせて考える事で、光照射により linker 部分のヘリックスが壊れ、溶媒との相互作用が強まり、拡散係数が大きく変化したと解釈した。以上から linker 部分のヘリックス崩壊という劇的な反応が光照射後 1ms で誘起されると結論づけられる。

【議論】これら蛋白質全体の反応は過渡吸収測定では捉えられていないことから、吸収変化を伴わない”spectral silent”な反応であると言える。特に LOV2-linker 試料で観測されたヘリックス崩壊反応は、光情報伝達に重要な役割を担っていると考えられる。他の研究により、LOV2 と linker が疎水性相互作用により結合しており、光照射によりこの相互作用が壊れ、解離すると報告されているが[2]、本研究で観測された LOV2(ダイマー)の解離反応(時定数 300 μs)がこの相互作用変化に対応していると考えられる。これら一連の反応検出は、シグナル伝達過程を直接捉えていることに他ならない。本研究結果から、発色団近傍のわずかな構造変化が LOV2 linker 間の解離を誘起し、これによって linker に存在するヘリックスが不安定化され壊れるという反応機構が提唱される。以上の結果を基に、LOV2 ドメインが光を受け取ってからキナーゼドメインが活性化されるまでのシグナル伝達機構に関する考察を行う。

参考文献

- [1] Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima., *Biophys. J.*, 91: 645, 2006,
- [2] S. M. Harper, J. Christie, K. H. Gardner. *Biochemistry*. 43: 16184-16192, 2004.

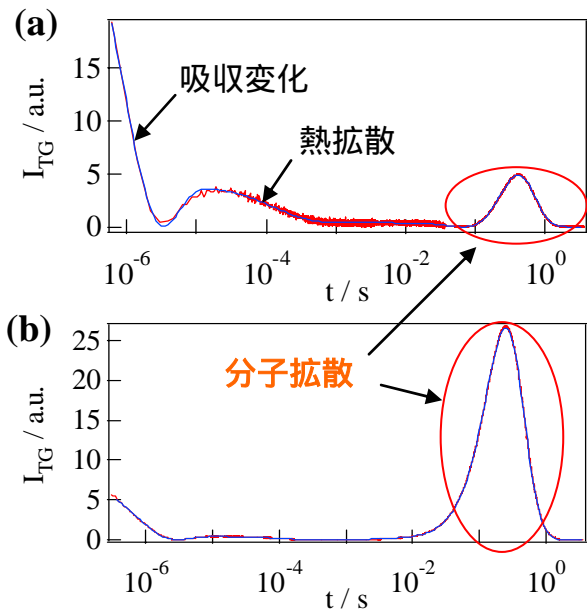


図2 (a) LOV2、(b) LOV2-linkerのTG信号