

3P111 青色光受容体フォトトロピンに見られる Spectral silent Process

(京大院理¹・大府大院理²) 永徳 丈¹・中曽根祐介¹・松岡大介²・徳富哲²・寺嶋正秀¹

【序】

フォトトロピン(Phot)は植物の青色光受容蛋白質の1つであり、植物が光のある方向へと伸びる機構(光屈性; *phototropism*)に関わるセンサー蛋白質である。この蛋白質はLOVドメインと呼ばれる多くのセンサー蛋白質に共通に見られるドメイン構造を持ち、その反応に伴う構造変化に興味をもたれている。Photでは、発色団FMNがLOVドメインに非結合的に結合しているが、青色光の吸収でLOVドメインと共有結合を形成し、数秒~数十秒で共有結合が切れて暗状態に戻るという光サイクル反応をする。しかし、ロドプシンなどのセンサー蛋白質とは違い、吸収スペクトル変化で検出される中間体は非常に少ない。これに対し我々は、吸収スペクトル変化を伴わない構造変化としてLOVドメイン外部にある α -helixが壊れる中間体があり、それによって分子の並進拡散係数が大きく変わることを過渡回折格子法により明らかにしてきた⁽¹⁾⁽²⁾。ここでは、熱力学量を時間分解で詳細に測定する事により、中間体の構造や構造揺らぎに関する知見を得る事を試みた。

【方法】

シロイヌナズナ由来 Phot2 の LOV2 付近を大腸菌で発現・精製したサンプルを用いた。(右図、LOV2-linker sample と LOV2 sample) 熱力学量測定のために、過渡レンズ(TrL)法を用いた。

【結果と考察】

LOV2 サンプル溶液を光励起した後の屈折率変化による過渡レンズ信号(以下TrL信号)をFigure1に示す。熱参照試料からの信号は熱レンズ信号に対応し、その減衰は熱拡散で決まる。しかしLOV2からの信号には、熱由来の信号だけでなく、10ミリ秒で立ち上がる弱い成分が観測された。過渡吸収を用いた研究でこの時間領域での変化は報告されていないので、この屈折率変化は体積変化によるものだと考えることができる。解析の結果、時定数 10msで、約 $0.8\text{cm}^3/\text{mol}$ の体積膨張が起こっていることがわかった。また、この体積変化の量は温度にはほぼ依存しなかった。

LOV2-linkerサンプルについて得られたTrL信号をFigure2に示す。LOV2 サンプルで見られたものと同程度の寿命での体積膨張 ($\Delta V \sim 0.9\text{cm}^3/\text{mol}$)と同時に、1 msほどの時定数で減衰として観測され

Phot2

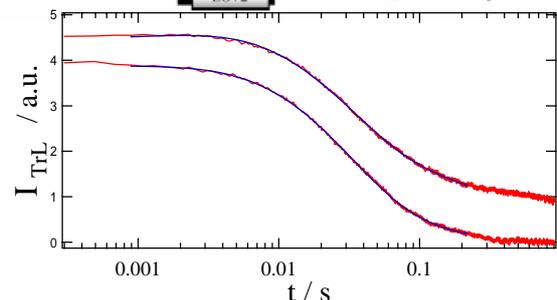


Fig. 1 LOV2 サンプルの TrL 信号
上: LOV2 試料溶液の信号、
下: 熱参照試料溶液の信号

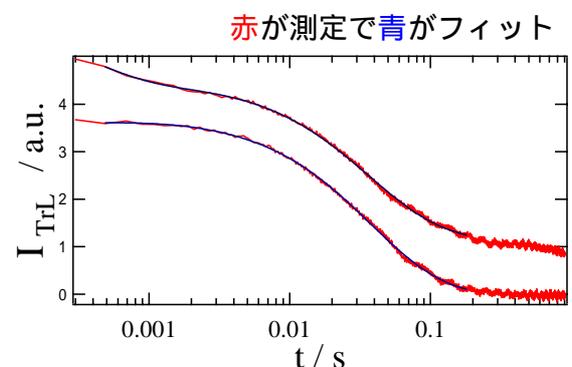


Fig. 2 LOV2-linker の TrL 信号
上: LOV2+Linker試料溶液の信号、
下: 熱参照試料の信号

ている体積収縮 ($\Delta V = -1\text{cm}^3/\text{mol}$) ダイナミクスが観測された。10 ms 成分はLOV2 サンプルで同じような結果が得られていることから、LOV2 ドメインでの変化であり、1ms成分がLinker付近での変化を反映していると考えられる。

さらに、温度依存性を調べた所、10 ms成分の体積変化には温度依存性はほとんどなかったが、1 ms成分の体積収縮には温度依存性が明確に観測された (Fig.3)。温度上昇と共に体積減少量が減少する事は、温度上昇で中間体の分子体積が増加することを示している。即ち、体積変化の温度依存性で定義される熱膨張係数 α_{th} の差が正であることを表す。熱膨張係数 α_{th} は、構造揺らぎの度合いを表すパラメータと考えられるので、観測された温度依存性の違いは、蛋白質部分の各部分によって揺らぎの度合いが違っていることを示す。以上のことは、LOV2 そのものは構造揺らぎが小さく、外部についているLinker部分は揺らぎが大きいという構造揺らぎの違いを反映していると解釈され、揺らぎと反応との関わりを考える上で重要な知見である。

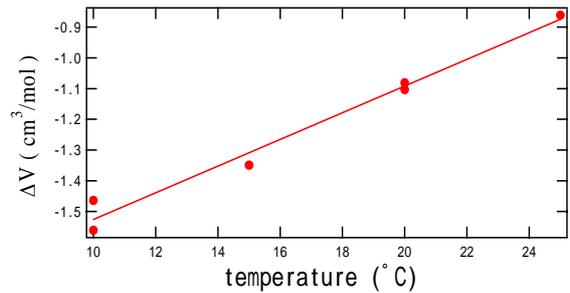


Fig.3 体積収縮成分の温度依存性

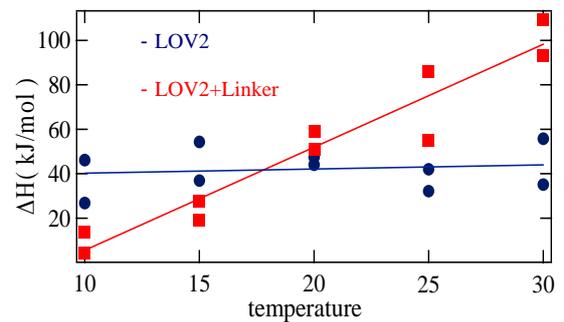


Fig.4 H の温度依存性

また、放出された熱量を測定試料と熱的参照試料とで比較することにより、中間体のエンタルピー変化 (ΔH) を求めた。その結果を Fig.4 に示す。20 付近では両サンプルともおよそ $\Delta H = 50\text{kJ/mol}$ 程度であったが、LOV2 ではその温度依存性がなかったのに対し、LOV2-Linker では明確な温度依存性が観測された。熱容量変化 (C_p) はこの ΔH の温度依存性として定義され、蛋白質においては、疎水性残基の露出面積との相関があることが知られている。Linker のあるサンプルでのみ C_p が正の値をとったということは、この Linker 部分付近の構造変化に伴って疎水性残基露出が起こったということがわかる。このような構造変化の情報と揺らぎの情報をあわせる事で、LOV ドメインの反応と信号伝達に関する機構を議論する。

【参考文献】

- (1) T.Eitoku et.al., *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 13238-13244
- (2) Y.Nakasone et.al. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 645-653