

### 業績紹介：光センサータンパク質フォトトロピンの隠された機能？

寺嶋正秀

(京都大大学院・A01 計画研究代表者)

論文題目："Stability of dimer and domain-domain interaction of Arabidopsis phototropin 1 LOV2"

著者：Y. Nakasone, T. Eitoku, K. Zikihara, D. Matsuoka, S. Tokutomi, M. Terazima

雑誌巻号：J.Mol.Biol., 383, 904-913 (2008).

タンパク質の機能を理解する上で、その分子レベルでの化学反応を明らかにすることが重要であることは、よく認識されている。しかし、逆に、そうした反応機構の研究から新しい機能が見出されることもありうるであろう。まだそうした例は少ないが、ここでは光センサータンパク質であるフォトトロピンの反応機構を研究した結果、この同じタンパク質が温度センサーとしても働いているかもしれないという興味深い結果を得たので、ここで報告する。

フォトトロピンは植物体内で光屈性や葉緑体光定位運動等を制御する青色光受容蛋白質である。青色光を受けると LOV ドメインのポケットにある発色団 FMN が LOV ドメインと共有結合し、その後再び解離して基底状態に戻るという光反応サイクルのあることが過渡吸収などで知られている。しかし吸収変化は 1 $\mu$ s で終わり、発色団と LOV ドメインが共有結合してから解離する間に、どのような変化があるのかは、まだ未知の部分が多い。こうした反応機構解明を目指して、我々は過渡回折格子 (TG) 法に基づいた研究をしてきた。これまでに、モノマーの Phot1LOV2 を光励起すると、2 量体反応が起こること、基底状態で 2 量体の Phot1LOV2 を光励起すると光解離反応が起こることを示してきた[1]。今回こうした反応の温度依存性を調べたところ、特徴ある信号変化が見られた。まず、Phot1LOV2 の TG 信号強度は、図 1(上)に示すように温度減少とともに信号強度が減った。信号強度現象の原因としては、反応速度の減少や拡散係数に影響を与える粘度の温度依存性などがあるが、こうした明白な効果を除いても、強度が減少していることが明らかとなった。Phot1LOV2 では、暗状態でモノマーとダイマーが平衡になっていること、モノマーの会合反応とダイマーの解離反応は信号の符号が逆なので、信号が重

なると打ち消しあって信号が弱くなることなどを考え合わせると、この温度依存性はモノマーとダイマーの存在比の温度依存性を表していると考えられる。つまり、低温になるほどダイマーの存在比率が増えて、高温で見られるモノマーの会合反応を打ち消していると解釈できた。一方で、LOV ドメインにリンカーのついた Phot1LOV2-linker では、逆に温度減少とともに信号強度の増大が見られた。この原因を先に述べた Phot1LOV2 の分子間相互作用の温度依存性と考え合わせると、拡散係数変化の原因となり、生体機能に重要な部分であるリンカー部分が、高い温度では暗中でも LOV ドメインから離れているため (Phot1LOV2 ではモノマーに対応)、反応しない分子が多くなったと考えた。つまり、温度が高いと光反応で起こる構造変化がすでに起こっており、光照射で反応する分子と反応しない分子の分布数に温度依存性があるという結論であり、このことより、Phot 反応の生体内での働きを考えると、このタンパク質が温度センサーとして働いていると推測できる。

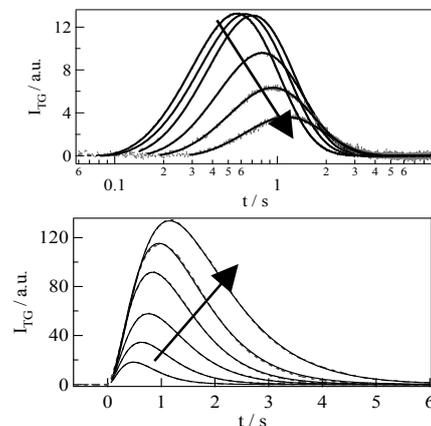


図1 Phot1LOV2 ドメインの TG 信号の温度依存性(上)と Phot1LOV2-linker の TG 信号の温度依存性(下)。矢印は温度減少方向を表す。

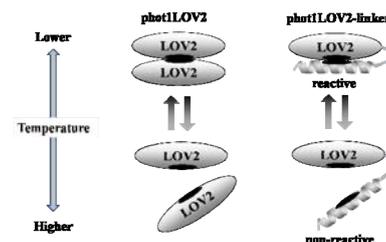


図2 Phot1LOV2(左)と Phot1LOV2-linker(右)の温度依存性を説明する模式図。

参考文献：[1] Biophys.J., 91, 645-653(2006).

### 業績紹介：PixD 光センサーの多量体構造依存的反応

寺嶋正秀

(京都大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目："Oligomeric State-Dependent Conformational Change of a BLUF Protein TePixD (Tll0078)"

著者：K.Tanaka, Y. Nakasone, K.Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, M.Terazima

雑誌巻号：J.Mol.Biol., 386, 1290-1300(2009).

光センサータンパク質に限らず、機能を発揮するタンパク質には多量体構造をもつものが多い。こうした多量体構造は反応にどのような意味を持つのであろうか。ここでは、ユニークな多量体構造を取る PixD という青色光センサータンパク質において、その機能に関する反応機構を調べ、多量体構造依存的な反応を見出した。

TePixD は好熱性シアノバクテリアのもつ青色光センサータンパク質である。青色光の受容のために、発色団としてフラビンを結合する BLUF (sensors of Blue Light Using FAD) ドメインを持ち、その構造や反応機構が近年注目を集めている。しかしながら、光情報伝達過程において重要な役割を果たすタンパク質全体の動的な構造変化については、ほとんど明らかにされていない。そこで我々は、過渡回折格子(TG)法を用い、拡散係数( $D$ )変化の時間分解検出から、吸収変化では捉えきれない TePixD の構造変化ダイナミクスを検討した。

試料には好熱性シアノバクテリア BP-1 由来の TePixD を用いた。TePixD は図 1 に示したような 10 量体構造が結晶中で得られており、溶液中でもその分子量は 10 量体を示すものであった。TePixD を青色光で励起した後に観測される TG 信号には、早い時間領域の熱拡散や、過渡吸収では検出されない  $40 \mu\text{s}$  の時定数をもつ体積膨脹を表す信号が観測され、さらにミリ秒領域に光誘起の  $D$  変化に起因する山型の信号(図 2)が見られた。解析の結果、光反応により  $4 \text{ ms}$  の時定数で  $D$  が減少する構造変化があることが明らかとなった。さらに拡散信号の濃度依存性測定の結果、 $D$  変化を起こす分子数が濃度に従って減少することが分かった。ゲル濾過による分子量測定によると、TePixD は暗状態で 5 量体と 10 量体の間に平衡が存在し、高濃度では

10 量体の割合が増えることがわかった。これらの結果を合わせて考えると、観測された濃度依存性は、光照射によって十量体のみが構造変化することを示していると解釈できる。この決定した反応スキームを図 3 に示した。なぜ 10 量体がこの機能を発揮する反応にとって重要なのかを、現在検討している。

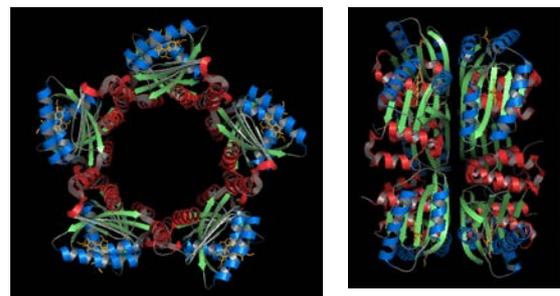


図 1 Te-PixD の 10 量体構造(左：トップビュー、右：サイドビュー)

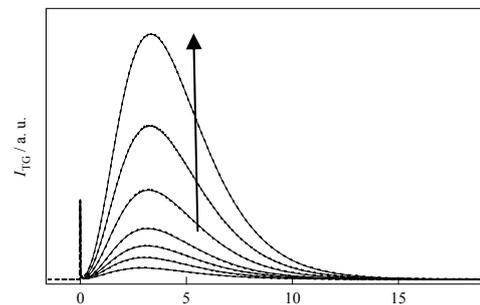


図 2 TePixD を光励起した後の TG 信号とその濃度依存性。信号は励起された濃度で規格化されているにもかかわらず濃度が増加すると拡散係数変化を示す信号強度が増大する。矢印は濃度増加の方向。

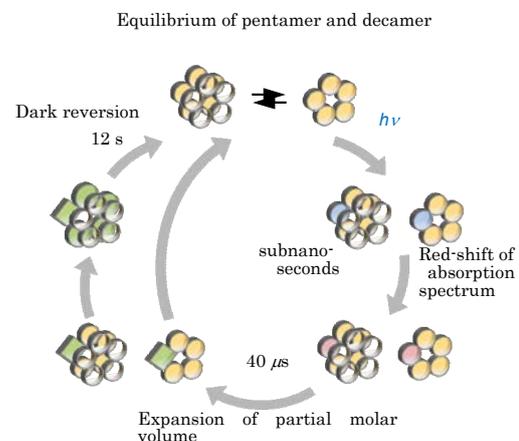


図 3 TePixD の反応模式図。

### 業績紹介：レプリカ交換シミュレーションによる膜蛋白質の立体構造予測

岡本祐幸

(名古屋大院理・A01 計画研究代表者)

論文題目："Analysis of helix-helix interactions of bacteriorhodopsin by replica-exchange simulations"

著者：Hironori Kokubo and Yuko Okamoto

雑誌巻号：*Biophys. J.* **96**, 765-776 (2009)

蛋白質には、水溶性蛋白質と膜蛋白質が存在するが、膜蛋白質の立体構造決定の実験的技術の困難から、Protein Data Bank (PDB) の座標データベースに登録されているほとんどの蛋白質は水溶性蛋白質である。しかし、いろいろなゲノム解析で分かったことは、いろいろな生物種において、膜蛋白質が全体の約4分の1から3分の1の数を占めるということであった[1]。よって、膜蛋白質の立体構造決定は喫緊の重要性を持つ問題である。

本研究では、実験的手法が困難ならば、計算機シミュレーションによって、膜蛋白質の立体構造予測を決定する手法を開発することを目指している。しかし、蛋白質のような多自由度複雑系には、系にエネルギー極小状態が無数に存在するために、従来のシミュレーションを実行するだけでは、すぐそれらのエネルギー極小状態に留まってしまって、精度の良い構造予測は絶望的に難しくなる。我々は、構造揺らぎを人工的に誘起して、エネルギー極小状態に留まるのを回避する、拡張アンサンブル法 (generalized-ensemble algorithm) と総称されるシミュレーション手法を蛋白質の立体構造予測に適用することを主張してきた[2]。本研究では、それらの強力な手法のうち、特に広く使われている、レプリカ交換法 (replica-exchange method) [3]を適用した。

我々の膜蛋白質立体構造予測の手順は以下のようである。まず、アミノ酸配列の中から、膜貫通ヘリックスの部分だけを取り出す。これは、SOSUI [1]などを使うと非常に精度良く膜貫通部分を予測することができる。次に、これらの膜貫通ヘリックスだけのレプリカ交換シミュレーションを実行するが、主鎖のヘリックス構造は剛体として扱い、平行移動と回転により様々な構造揺らぎを作りだす。また、側鎖は剛体ではなく、

自由に動かす。これは、膜蛋白質では多くの場合、膜貫通ヘリックス同士の側鎖が密に絡み合っているからである。すなわち、側鎖の充填シミュレーションの成否が全体の立体構造予測に大きく影響するのである。

図1にバクテリオロドプシンの7本の膜貫通ヘリックスのレプリカ交換シミュレーションの途中経過 (スナップショット) を示す。レプリカ交換により、幅広い構造空間が効率良く探索されていることが分かる。

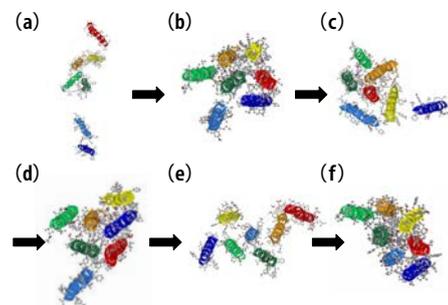


図1：バクテリオロドプシンの膜貫通ヘリックスのレプリカ交換シミュレーションのスナップショット。

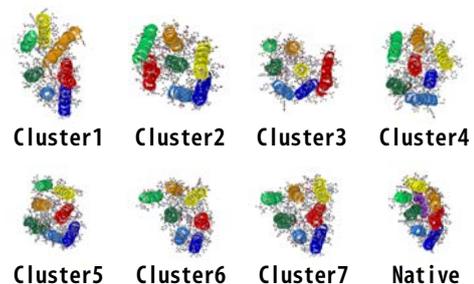


図2：得られた7つの構造と自然の構造の比較。

また、図2には最終的に得られた7つの構造を自然の構造と比較した。Cluster 1 の構造が自然の構造と全く同じヘリックス配置をしていることが分かる。

本手法を構造未知の膜蛋白質に適用して、立体構造予測を行っていくのが本研究の将来的な目標である。

参考文献

- [1] 例えば、美宅成樹、*生物物理* **42**, 104-109 (2002).
- [2] 例えば、岡崎進、岡本祐幸 (編集)、*化学フロンティア* No. 8 「生体系のコンピュータ・シミュレーション」 (化学同人、2002) 第2章。
- [3] K. Hukushima and K. Nemoto, *J. Phys. Soc. Jpn.* **65**, 1604-1608 (1996); Y. Sugita and Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141-151 (1999).