

青色光受容蛋白質 PixD におけるフラビン近傍チロシンの水素結合構造とシグナル伝達機構

高橋亮太¹、鈴木博行¹、岡島公司²、中村寛夫^{3,4}、池内昌彦²、野口巧¹

(¹ 筑波大学・数理物質科学、² 東京大学・総合文化、³ 理研・播磨研究所、⁴ 横浜市立大学・国際総合科学)

e-mail: s-takahashi@ims.tsukuba.ac.jp

【序論】PixD は、シアノバクテリアの走光性に関与する青色光受容フラビン結合蛋白質であり、フラビンの青色光吸収により、吸収スペクトルの長波長シフトを示す。最近明らかにされた好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来の TePixD の X 線結晶解析構造によると、フラビンの C4=O 基の近傍には、グルタミン(Gln50)及びチロシン(Tyr8)が存在し、C4=O への水素結合ネットワークを形成している[1]。また、長波長シフト状態(明状態)では Gln50 と C4=O の間に強い水素結合が形成されていると考えられる。しかし、その水素結合ネットワークの詳細な構造や、光反応への関与、及び PixD の機能における役割は不明である。そこで本研究では、Tyr 側鎖を選択的に同位体置換した His-TePixD を用いて、その光誘起フーリエ変換赤外 (FTIR) 差スペクトルを測定し、Tyr8 の光反応への関与を調べた。さらに、量子化学計算を用いて FTIR スペクトルを解析し、Tyr8 の水素結合構造と、その変化によるシグナル伝達機構について調べた。

【研究方法】大腸菌において His-TePixD を発現し、精製を行った。試料の温度を 10 に保ち、白色定常光照射前後の FTIR 差スペクトルを測定した。量子化学計算は、分子軌道計算プログラム Gaussian03 により、B3LYP functional 及び基底系 6-31+g(d,p)を用いて行った。

【結果及び考察】Tyr の水酸基が結合する 4 位の炭素を ¹³C で同位体置換した

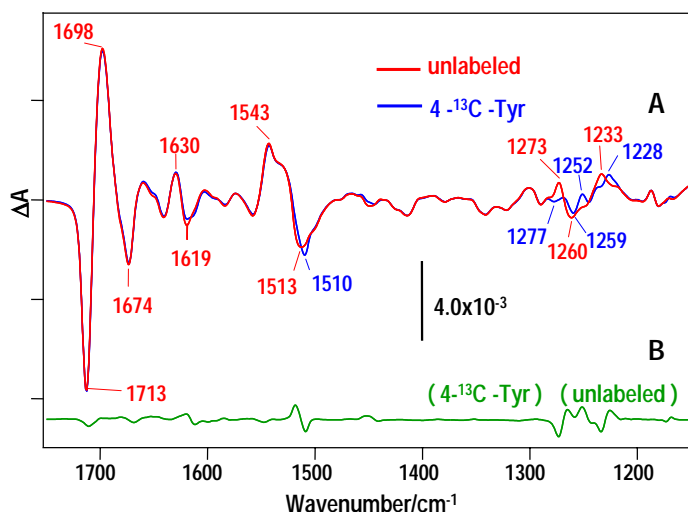


図 1. PixD の光誘起 FTIR 差スペクトル

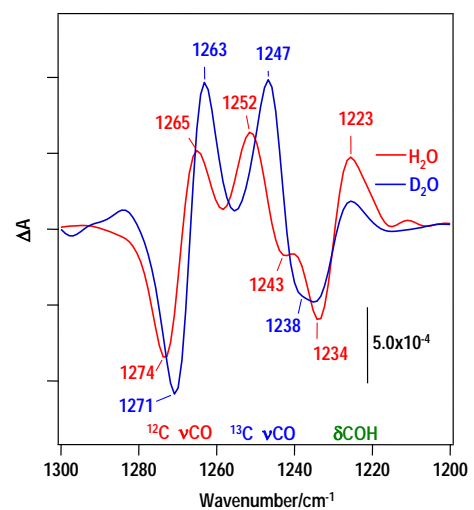


図 2. PixD の (4-¹³C-Tyr) - (4-¹²C-Tyr)

二重差スペクトル(vCO,δCOH 領域)

[4-¹³C-Tyr]PixD と非置換 PixD について、それぞれの光誘起差スペクトルを測定した(図1A)。これらの二重差スペクトル(図1B)には、1520 - 1505 及び 1275 - 1220 cm⁻¹の領域に、Tyr 側鎖に由来するピークが現れた。このことから、PixD の光反応により、フラビン近傍に存在する Tyr8 に構造変化が起こることが示された。さらに、軽水及び重水中における二重差スペクトル(図2)の比較から、1265/1274 cm⁻¹のピークを、暗状態/明状態における Tyr8 の CO 伸縮振動(νCO)に帰属した。これらの値から Tyr8 の水素結合構造を明らかにするため、Tyr 及び Gln 側鎖のモデル分子として、それぞれ *p*-クレゾールとアセト

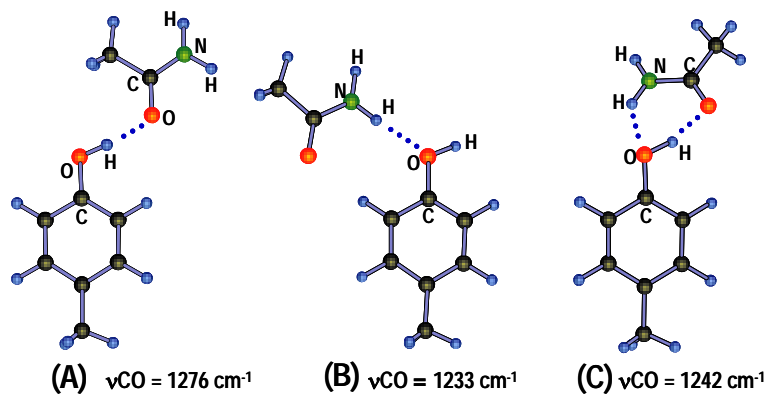


図3. Tyr と Gln の水素結合複合体モデル及び水酸基のνCO の振動数

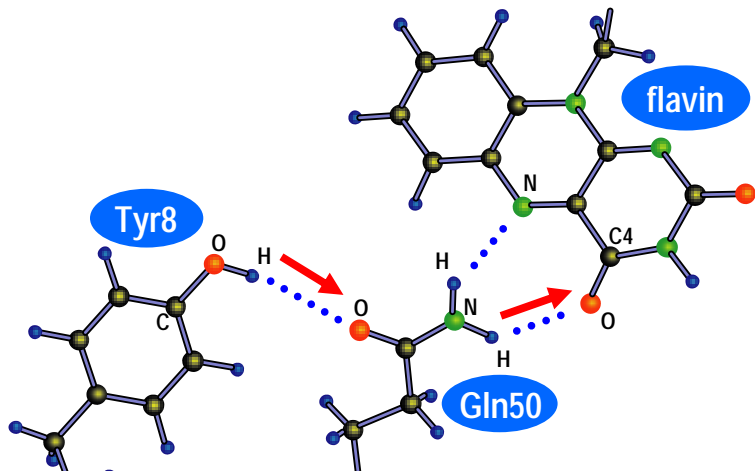


図4. フラビン、Gln50 及び Tyr8 の水素結合ネットワーク

アミドを用い、その水素結合複合体(図3)について、量子化学計算による構造最適化及び振動解析を行った。その結果、図3Aの構造(νCO = 1276 cm⁻¹)が最も良く Tyr8 の実測 νCO を再現したことから、Tyr8 の OH 基は Gln50 の C=O と水素結合を形成していることが明らかとなった(図4)。また、異なる水素結合強度を持つ *p*-クレゾールの水素結合複合体についての振動解析から、νCO の光反応による 9 cm⁻¹ の高波数シフトは、Tyr8 と Gln50 間の水素結合強度の増大を意味することが示された。さらに、Gln のアミド基の NH₂ と C=O には、水素結合に関する正の協同性が存在することが示され、フラビン C4=O の水素結合強度の変化は、Gln50 のアミド基を介して Tyr8 に伝達されることが示唆された(図4)。これらの結果より、フラビンの C4=O から Gln50、Tyr8 へと続く水素結合ネットワークが、PixD のシグナル伝達機構において重要な役割を果たしていると考えられる。

[1] Kita et al. (2005) *J. Mol. Biol.* 349, 1-9.