

# フラビンを発色団としてもつ青色光受容 BLUF タンパク質の活性部位構造の解析

○海野 雅司<sup>1</sup>、増田 真二<sup>2</sup>、小野 高明<sup>3</sup>、山内 清語<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>佐賀大・理工、<sup>2</sup>東工大・生命理工、<sup>3</sup>茨城大・工、<sup>4</sup>東北大・多元研)  
unno@cc.saga-u.ac.jp

【序論】ロドプシンや Photoactive Yellow Protein、フォトトロピンのように多くの光受容タンパク質では発色団の光異性化や光誘起の共有結合形成など発色団の大きな構造変化が引き金となってタンパク構造が変化し、信号伝達などの機能を実現している。しかし、フラビンを発色団としてもつ BLUF (blue-light using FAD) タンパク質で、発色団の大きな構造変化を伴わない光受容メカニズムが見いだされた。BLUF タンパク質は FAD (flavin adenine dinucleotide) を発色団としてもつ青色光受容体で、シグナル状態では FAD の吸収極大が約 10nm 長波長シフトし、C4=O 伸縮振動モードが約 16cm<sup>-1</sup> 低波数シフトすることがわかっている[1,2]。しかし、シグナル状態生成の光反応機構はよく分かっていない。

代表的な BLUF タンパク質として紅色光合成細菌における光合成系の発現制御に関与した AppA がある[3]。AppA の BLUF ドメインの結晶構造が最近報告され[4]、図 1 A のように Gln63 のアミノ基は暗状態においてフラビン環 N5 部位と水素結合を形成しているが、シグナル状態では図 1 B のように~180°反転して C4=O 部位と水素結合するメカニズムが提唱された。しかし、ほぼ同時に報告された他の BLUF タンパク質の結晶構造では AppA におけるシグナル状態 (図 1 B) に対応する構造が暗状態の構造として報告されており[5,6]、BLUF タンパク質の光反応機構を論じる上で、溶液中における Gln63 残基の配向を決めることが極めて重要となっている。そこで本研究では Gln63 を Leu に置換した Q63L 変異体について検討し、このアミノ酸残基の配向について検討したので報告する[7]。

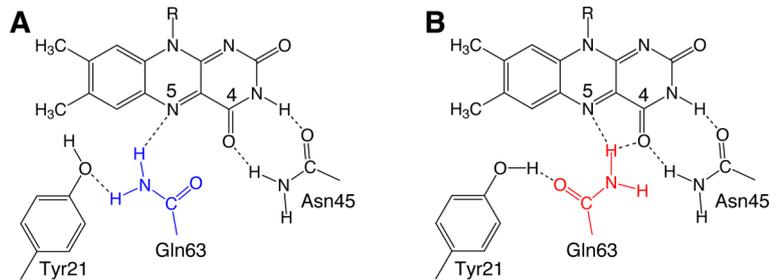


図 1. AppA BLUF ドメインの活性部位構造。Gln63 の配向が異なる 2 つの構造が考えられる。

【実験と解析】AppA の BLUF ドメイン (AppA126) の野生型 (WT) ならびに Q63L 変異体のラマンスペクトルの測定には Kr レーザーの 647.1nm 光 (170mW) を用いた。また密度汎関数法 (DFT、B3LYP/6-31G\*\*) による振動解析や電子遷移エネルギーの計算を行った。計算には Gaussian03 を用いた。

【結果と考察】図 2 A に AppA126 の吸収スペクトルを示した。スペクトルから、Q63L 変異によってフラビンの吸収極大 ( $\lambda_{\max}$ ) が約 10nm 短波長側にシフトすることがわかった。また Q63L 変異体に青色光を照射しても吸収スペクトルに変化は見られず、AppA が機能す

る上で、この Gln63 が必須であることがわかった。図 2 B に WT ならびに Q63L AppA126 のラマンスペクトルを示した。図からわかるように変異体のラマンスペクトルは WT と類似しており、C4=O 伸縮振動モード ( $\Delta_{10}$ ) も  $4 \text{ cm}^{-1}$  ほど高波数側へシフトしているのみであった。カルボニル酸素への水素結合がなくなると C=O 伸縮振動は通常  $30 \text{ cm}^{-1}$  程度高波数シフトすることが期待

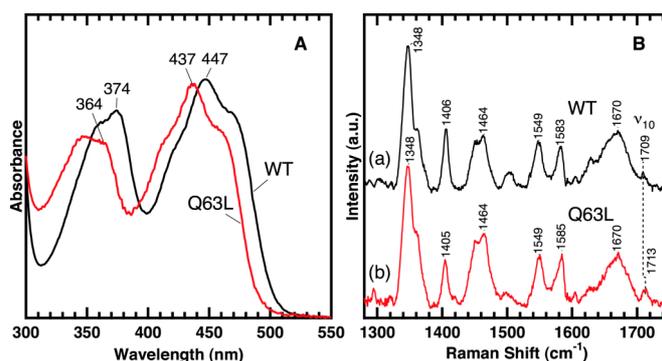


図 2. Q63L 変異の(A)吸収スペクトルならびに (B)ラマンスペクトルへの効果。

されることから、Gln63 を Leu に置換しても C4=O 部位への水素結合はほとんど変化しないと考えられる。この結果は暗状態において Gln63 と C4=O 部位に水素結合が存在しないことを意味しており、暗状態の構造は図 1 A であることが強く示唆された。

次に上記結果をより定量的に調べるために、結晶構造[4]をもとに図 3 に示した活性部位

モデルを用いて、 $\Delta_{\max}$  と  $\Delta_{10}$  に対するアミノ酸置換の効果を検討した。その結果、N5 部位への水素結合を取り除く変化 (model 1 → model 2) は Q63L 変異の効果を良く再現するが ( $\Delta\Delta_{\max} = -11 \text{ nm}$ ,  $\Delta\Delta_{10} = 6 \text{ cm}^{-1}$ )、C4=O への水素結合を取り除く変化 (model 3A-C → model 2) は実験結果を良く再現しなかった。これらの結果は暗状態において Gln63 側鎖と C4=O の間に水素結合が存在しないことを意味しており、この系の信号伝達経路に関して、図 1 A → 1 B のような Gln63 側鎖の光反転モデルが指示された。

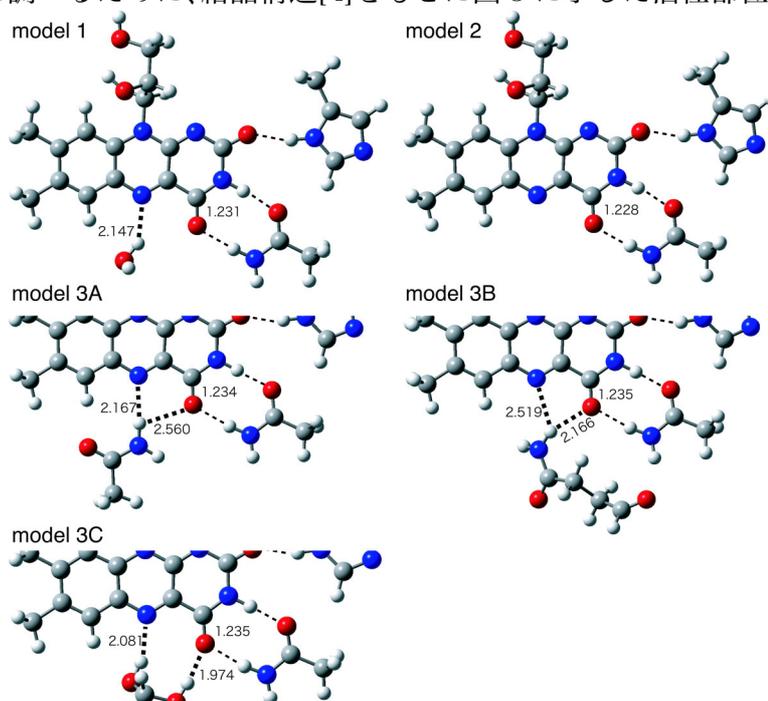


図 3. AppA の活性部位モデル (最適化構造)。主な水素結合ならびに C4=O 結合長 (Å) を示した。

- [1] S. Masuda, K. Hasegawa, A. Ishii, T. Ono, S. Yamauchi (2004) *Biochemistry* 43, 5304-5313.
- [2] M. Unno, R. Sano, S. Masuda, T. Ono, S. Yamauchi (2005) *J. Phys. Chem. B* 109, 12620-12626.
- [3] S. Masuda, C. E. Bauer (2002) *Cell* 110, 613-623.
- [4] S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat, C. Bauer (2005) *Biochemistry* 44, 7998-8005.
- [5] A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto, M. Ikeuchi, K. Miki (2005) *J. Mol. Biol.* 349, 1-9.
- [6] A. Jung, T. Domeratchva, M. Tarutina, Q. Wu, W. H. Ko, R. L. Shoeman, M. Gomelsky, K. H. Gardner, L. Schichting (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12350-12355.
- [7] M. Unno, S. Masuda, T. Ono, S. Yamauchi (2006) *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5638-5639.