

4B12

PELDOR法による青色光センサータンパク質 SyPixD 重合体のタンパク間

相互作用の解析

近藤徹¹・筒井和彦¹・増田真二²・三野広幸¹
(1: 名大院理 2: 東工大院生命理工)

【序】

植物やシアノバクテリアは青色光に対し様々な光応答機構をもつ。BLUF (sensor of Blue Light Using FAD) ドメインは Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) 分子を発色団として持ち、光合成遺伝子の発現調整、走光性、光驚動性の制御を行う青色光センサータンパク質として機能する。*Synechocystis* sp. PCC6803 の BLUF ドメインタンパク質である SyPixD の結晶構造は 1.8 Å の分解能で解明され、環状の 5 量体が 2 つ重なった 10 量体構造を形成することが明らかになっている [1] (図 1)。重合体形成には PixE タンパク質が重要であり、PixE 存在下暗条件下で PixD : PixE = 10 : 5 の重合体が形成され、光照射で PixD 2 量体と PixE 単量体に分解される[2]。これら高次構造の詳しい機能は不明であるが、光誘起される重合体の分解反応がシグナル伝達を制御している可能性がある。

Thermosynechococcus elongatus BP-1 の BLUF ドメインタンパク質である TePixD では、100 K で 3 分間光照射した後光照射下で 30 K まで冷却することで安定な EPR 磁性種を生成する [3]。Pulsed-ENDOR (Electron Nuclear DOuble Resonance) 測定などから中性フラボセミキノンラジカル (FADH) と FAD 近傍に存在する中性チロシンラジカル (Y8) が双極子相互作用した状態に帰属されている[3]。この状態を 1 つのスピンのベクトルとみなすことができる。

PELDOR (Pulsed Electron eLectron DOuble Resonance) は 20 - 80 Å 離れた位置にあるスピンの間の相互作用を検出し距離及び角度を高精度で求めることができる手法である。各 PixD タンパク質に 1 つのスピンのベクトルが固定されているので、それらスピンのベクトル間の磁気的相互作用を検出し解析すればタンパク質同士の距離や相対角度が得られる。SyPixD 重合体の PELDOR 測定を行い、PixD タンパク質の重合体形成過程を調べた。

【実験】

暗順応させた SyPixD に 150 K で青色光 (30 mW) を 30 分間照射した。青色光はファイバーを通してサンプルに照射した。その後光照射下で 50 K まで冷却し、10 K で ESE (Electron

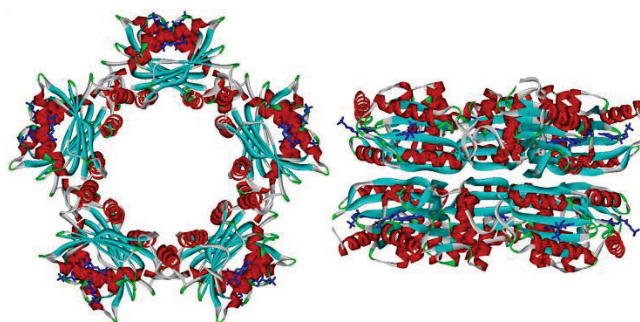


図 1 : SyPixD 10 量体の結晶構造 (PDB ID: 2hfn)
上面図 (左)、側面図 (右)

Spin Echo)-field swept EPR 測定、及び PELDOR 測定を行った。測定は Bruker ESP380E を使い、低温測定には Oxford CF935 system を使用した。PELDOR 測定には図 2 のパルス系列を用いた。

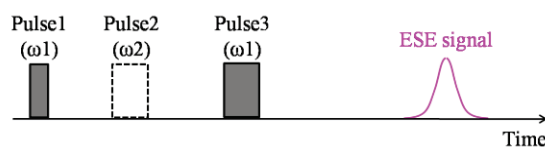


図 2 : PELDOR 測定のパルス系列
($\omega_1 \neq \omega_2$)

【結果と考察】

図 3 に SyPixD の ESE-field swept EPR スペクトルを示す。peak-to-peak 幅 74.9 G の 1 対の共鳴線をもつ対称的な信号が得られた。形から典型的な双極子相互作用由来の信号 (Pake's doublet 信号) とわかる。TePixD では peak-to-peak 幅 85 G の doublet 信号が得られている[3]。

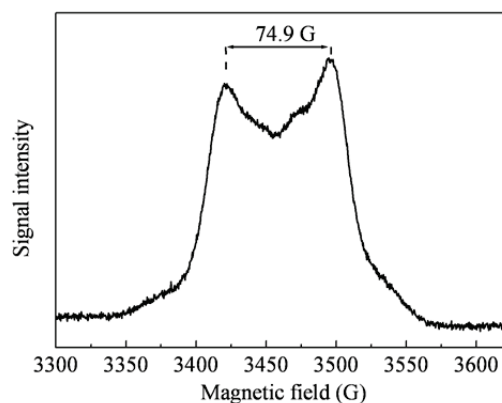


図 3 : ESE-field swept EPR で検出した Pake's doublet 信号

PELDOR は 2 つの周波数 ω_1 、 ω_2 のマイクロ波パルスを用いる (図 2)。 ω_1 で共鳴するスピンは、 ω_2 で共鳴する他のスピンと磁氣的相互作用を介して影響するため、最終的な ESE 信号強度が変化する。その強度変化から磁気相互作用の大きさが求まりスピン間距離がわかる。また、doublet 信号のように異方性が大きい場合、周波数の違いによって外部磁場に対し方向選択的にスピンを励起できるため、それぞれ特定の方角を向く 2 スピン間の距離を見積もれる。そこで会合体を形成する SyPixD タンパク質のスピンベクトルを方向選択的に励起し、スピンベクトル間の磁氣的相互作用を PELDOR で検出した (図 4)。挿絵は doublet 信号の励起位置を示している (▼: Pulse1、▽: Pulse2)。外部磁場と角度 90° を成すスピンベクトルと角度 0° を成すスピンベクトル間での PELDOR 信号は 1.3 MHz で振動し、2 スピンベクトル間距離は 40 \AA 程度と見積もられた。これらの結果から SyPixD 会合体内で各 SyPixD タンパク質がどのように配置しているかを議論する。

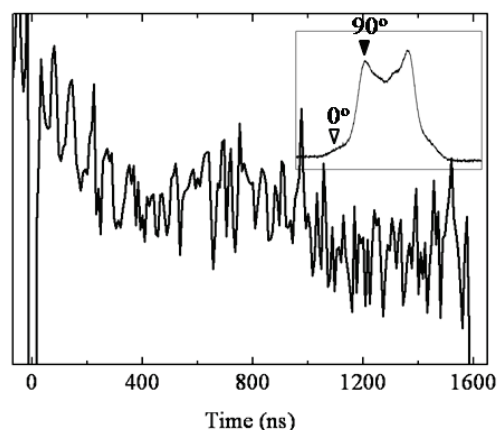


図 4 : スピンベクトル間の磁氣的相互作用を含んだ PELDOR 信号

参考文献

- [1] Yuan, H., Masuda, S., Dragnea, V., Anderson, S., Moffat, K., and Bauer, C.E. (2006) *Biochemistry*, 45, 12687-12694.
- [2] Yuan, H., and Bauer, C.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10895-10900.
- [3] Nagai, H., Fukushima, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M., and Mino, H. (2008) *Biochemistry*, 47, 12574-12582.