

4B13 時間分解 ESR 法による青色センサータンパク質 SyPixD の

光反応過程の解析

(名古屋大院・理¹, 東工大²) ○筒井和彦¹, 近藤徹¹, 増田真二², 三野広幸¹

【序】多くの植物やバクテリアは、青色光に対して様々な光応答機構を持つ。BLUF タンパク質は、最近発見された FAD を発色団としてもつ光センサータンパク質である。本研究では BLUF ドメインタンパク質の一種である *Synechocystis* に由来する SyPixD (Slr 1694) を対象とした。

図 1 は X 線結晶構造解析による SyPixD のフラビン周辺構造を示す。SyPixD は青色光を吸収すると、フラビンと近傍のアミノ酸残基間での水素結合ネットワークを変え、基底状態 D からシグナル伝達状態 F に変わる。このとき吸収帯が 10~20 nm 長波長シフトする。これまでに基底状態 D、シグナリング状態 F にいくつかの反応中間体が発見されている。

最近 PixD に 100~180 K で光照射すると、フラビン (FAD) と近傍のチロシン (Y) に由来する ESR 信号が観測できることが分かった [1]。本研究では SyPixD を用いて、FAD-Y・ラジカル生成、減衰を時間分解 ESR 法によって捕らえ、ラジカル生成の機能解明を試みた。

【実験】 ESR 測定は X-band ESP-300E (BRUKER) を用いて行った。

キャビティは円筒型 TE011 を使用した。低温測定には液体窒素を用い、温度制御には Oxford 910 クライオスタットシステムを使用した。光照射の光源には、波長 355 nm の YAG レーザー Surelite I を用いた。レーザー光はキャビティ内のサンプルに直接照射した。

【結果と考察】 光反応で生じるラジカル状態を実測し、スペクトルの強度の磁場依存の比較その性質を調べるため、ESR を用いて実験を行った。

図 2 A は、TePixD の基底状態 D に、温度 150 K で 150 秒間照射をして、CW ESR 測定をしたスペクトルである。

この信号は以前に TePixD で発見した、FAD-Y・ラジカル信号とほぼ同じ線形をもった信号

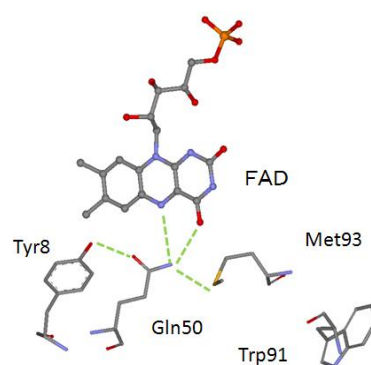


図 1 : SyPixD の FAD 周辺の構造
PDB : 2 HFO

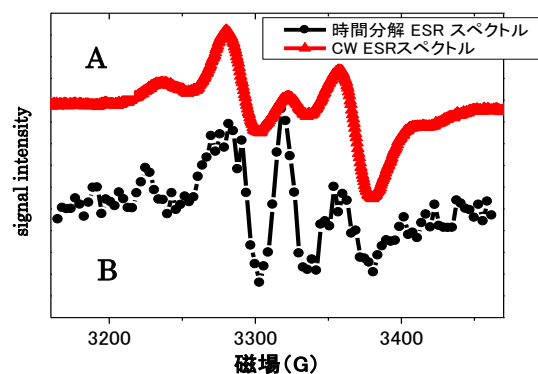


図 2 : (A) CW ESR スペクトル
(B) 時間分解 ESR による
SyPixD に生成する
ラジカル状態

である。わずかな違いは、TePixD において内側のピーク対の分離幅が 86 G であるのに対して、SyPixD では 81 G であった。この違いは、両者の局所構造のわずかな違いにより、FAD-Y・間の距離が異なっていることを示す。この ESR 信号は、双極子相互作用に由来しているので、電子の非局在化を点で置き換えて計算すれば、およそ 1 (Å)SyPixD の方が FAD-Y 8 間の距離が長いと見積もられる。図 2 B は、SyPixD を温度 200 K、100 KHz, 4 G の変調の下で測定した時間分解信号立ち上がり強度の磁場依存性である。150K で安定に捕捉されるものと同じラジカルが過渡的に現れていることがわかる。

時間分解能は変調磁場の周波数で制限される。速い時間領域を測定するために変調をかけずに直接吸収を観測し、測定を行った。図 3 は測定磁場 3250G、温度 200 K での時間分解スペクトルである。レーザー照射直後に生成し、240 ns の時定数で減衰する信号が存在することが分かった。

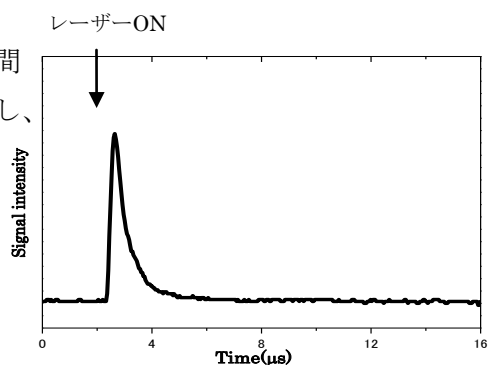


図 3 : 時間分解スペクトル (3250G)

図 4 は、温度 200 K で、3130G から 3430G までの直接吸収を測定した時間分解スペクトル強度の磁場依存である。変調の存在下でのスペクトルと同様に、両肩に分離幅 81 G のピークが見られた。これは変調下で測定された信号 (図 2 B) とほぼ一致する。このことから、この信号は、FAD-Y・の高速に減衰する成分であることが分かる。

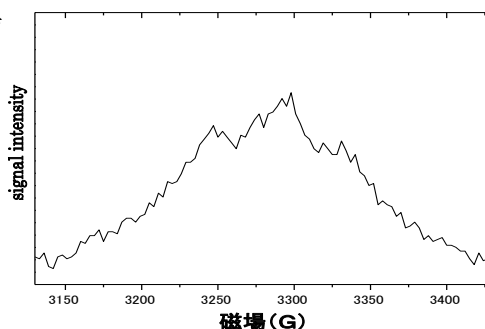


図 4 : レーザーで生成したラジカル信号の立ち上がり強度の磁場依存性

図 5 は 10 K で、基底状態 D のサンプルとシグナリング状態 F のサンプルを、時間分解 ESR 法で測定した場合の信号強度比較である。F 状態は、273 K で連続照射直後に急速凍結することによって生成した。10 K では光反応によって D→F 間の遷移が起きない為、生成したラジカルが D から生成するか、F から生成するのかを区別できる。図 5 より、D 状態のサンプルでは信号検出されていないのに対し、F 状態でのサンプルでは信号が検出されていることがわかる。これは短寿命でのラジカルは F 状態での光照射により生成していることを示している。

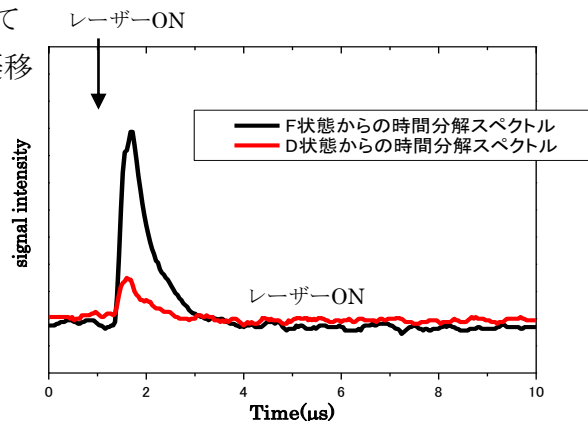


図 5 : 時間分解 ESR スペクトルの反応中間体の違いによるラジカル生成の違い

参考文献

- [1] Nagai, H. et al biochemistry (2008) 12574-12582