

BLUFドメインからLOVドメインへの変換？

(京大院・理¹, 大阪府大院・理²)○西海 健悟¹, 田中 啓介¹, 岡島 公司², 徳富 哲², 寺嶋 正秀¹

【序】生物の持つ青色光センサードメインとしては数種類が知られているが、なかでもBLUF(sensors of Blue Light using FAD)ドメインとLOV(light, oxygen, and voltage)ドメインがよく調べられていて有名である。興味深いことに、これらのBLUFとLOVドメインは非常に構造が似ていて、主な反応性の違いは発色団FAD近くの残基が引き起こしているのではないかという推測がなされている。もしそうであれば、この残基を変異するだけで2つのドメインの変換が可能ではないかと思われる。この推測の下、典型的なBLUFドメインを持つタンパク質である、シアノバクテリアの走行性の調節に関わる青色光センサータンパク質TePixDの変異実験が行われた。その結果、TePixDの発色団近傍のIle66残基をCys残基に置換したTePixD-I66Cは、LOVドメインのような吸収スペクトルを示すことが報告され、別のドメインに変換できるという興味深い結論になった⁽¹⁾。しかしながら、本当にタンパク質部分の構造変化が起こっているかどうかは不明であった。そこで、我々はタンパク質構造変化を見ることができる過渡回折格子(TG)法を用い、この変異体の光反応機構を調べた。

【実験】TePixD-I66C変異体が大腸菌において発現、および精製したものを用いた。TG測定では、波長465nmの色素レーザーを励起パルス光、840nmのダイオードレーザーをプローブ連続光とした。

【結果と考察】過渡吸収測定により、I66C変異体は2つの反応スキームが示唆されている。1つ目はBLUF型の反応であり、一重項励起状態を経て、サブナノ秒スケールで吸収変化のレッドシフトが起

き、その後約20msで基底状態に戻る。2つ目はLOV型の反応であり、Cys-フラビン結合の形成により、吸収変化のブルーシフトが起こり、10sほどで基底状態に戻る。よって、それぞれの時間領域でTG信号を観測することで、BLUF型とLOV型の構造変化を検出することができると思われる。

まず、図1にTePixD-I66Cを青色光で励起した後に比較的早い時間領域で観測されるTG

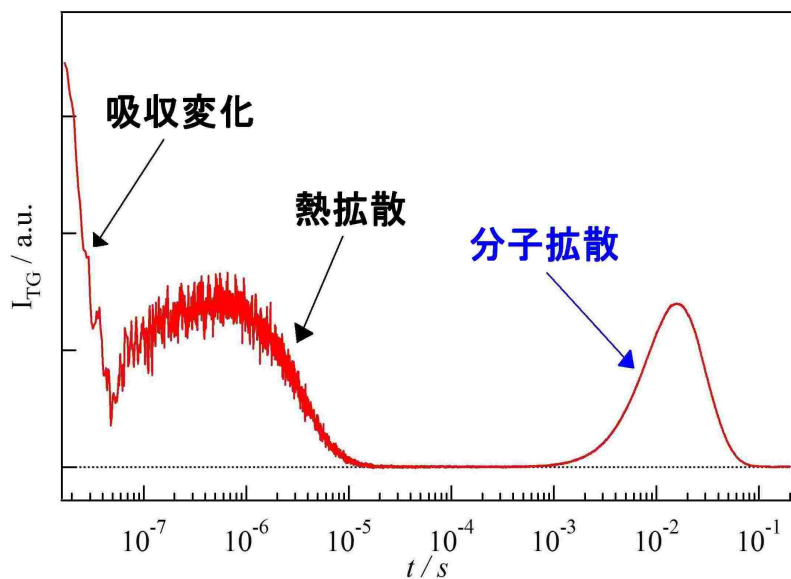


図1. TePixD-I66CのTG信号

信号を示す。サブマイクロ秒の減衰はCys残基を導入したことによるCys-フラビン結合の生成に起因する信号である。約10 μs スケールまでの減衰は励起分子から放出された熱の拡散信号である。その後のミリ秒領域の山型信号は、光誘起の拡散係数変化によるダイナミクスを示している。光反応生成物の拡散係数が反応物と異なるために山型の信号として観測される。定性的には、この信号はBLUFタンパク質であるPixDのWild type(WT)と非常に似ている。解析の結果、拡散係数が $4.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ から $2.8 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ へ減少するような反応が光誘起されることが明らかとなり、この時定数は300 μs と決定された。拡散係数はTePixDのWTの拡散係数変化($4.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ から $3.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) と似ており、WTと同様の構造変化をしていることが確認された。ただ、変化の時定数はWTの4msと比べてずっと速かった。発色団近傍の残基の変異により、発色団近傍の構造が不安定となり、反応が促進されたのではないかと考えられる。

図2は遅い時間スケールの時間分解検出が可能な小さいqでのTG信号である。LOV型の反応は10s以内に基底状態に戻るため、構造変化が起きているならば、おおよそ10ms-1sスケールにおいて拡散係数変化を表す信号が観測されるはずであるが、信号は全く観測されなかった。これはLOV型の反応では吸収変化は起こるものの、構造変化は起きていないことを示しているものと思われる。

よって、TePixD-I66C 変異体は図3のような2つの反応スキームを持ち、LOV型の吸収変化をするものの、タンパク質部分の構造変化はBLUFドメインと類似の変化しか起こっていないことが分かった。

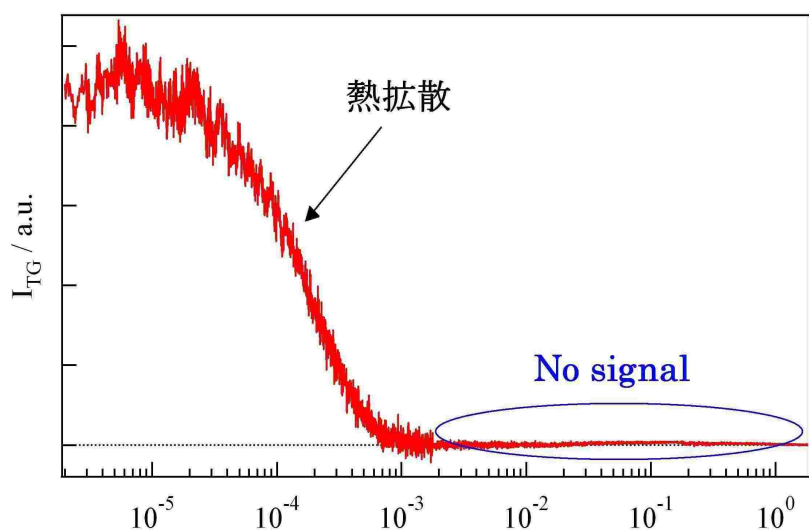


図2 . low-qでのTePixD-I66CのTG信号

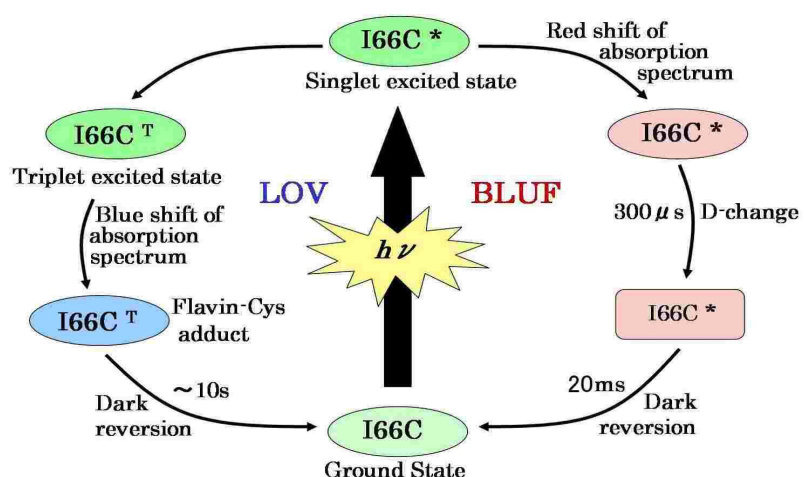


図3. TePixD-I66Cの反応スキーム

参考文献: 1. H.Suzuki, K. Okajima, M.Ikeuchi, T.Noguchi, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 12884-12885.