

BLUF ドメインの光活性化に伴う水素結合構造の赤外分光解析

(名工大院工¹, 名工大若手イノベータ², 東邦大薬³, 光産業創成大⁴) 岩田達也^{1,2}, 伊藤奨太¹, 伊関峰生³, 渡辺正勝⁴, 神取秀樹¹

FTIR study of hydrogen-bonding structures during the photoreaction of the BLUF domains

(Grad. Sch. Eng., Nagoya Inst. Tech.¹, Ctr. Fost. Yng. Innov. Nagoya Inst. Tech.², Dept. Pharmacol., Toho Univ.³, Grad. Sch. for Creation of Photonics Indust.⁴) Tatsuya Iwata^{1,2}, Shota Ito¹, Mineo Iseki³, Masakatsu Watanabe⁴, Hideki Kandori¹

【序】BLUF (sensor of blue-light using FAD) ドメインは発色団として FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) をもつ光受容体であり、バクテリアや真核生物において転写の抑制や光驚動反応など様々な機能に関わっている^{1,2}。BLUF ドメインは酸化型 FAD を暗状態 (BLUF) に持ち、光励起されると電子・プロトン移動の後に再び酸化型 FAD をもった光反応中間体 (BLUF_{red}) になる³。つまり、BLUF ドメインは他の光受容体とは異なり光活性化において発色団である FAD の化学構造が変化しないという特徴を持っている。BLUF_{red} の生成に伴い FAD 近傍に位置する Tyr と Gln との水素結合構造が変化することが活性化に必須であると考えられているが、BLUF 及び BLUF_{red} における水素結合ネットワーク構造は不明である (Figure 1)。そこで我々はフーリエ変換赤外 (FTIR) 差スペクトル分光法を用いた研究を開始した。特に注目したのは、水素結合ドナーとなる振動が現れる X-H 伸縮振動の領域であり、BLUF_{red} において Tyr の O-H 伸縮振動が 2800-2600 cm⁻¹ に現れることを発見した⁴。文献にないほどの低い振動数から、活性化によって Tyr が異常に強い水素結合を形成することを示している。本研究では、さらに研究を進め、BLUF 及び BLUF_{red} における水素結合構造の全貌を明らかにするため、系統的な同位体標識を用いた赤外分光解析を行った。

【実験】紅色細菌由来の AppA-BLUF ドメインは His タグを N 末端側に融合させたタンパク質として大腸菌により発現させた。同位体標識試料の作製は ¹³C グルコース、¹⁵NH₄Cl の入った培地を用いて行った。BLUF は封入体を生成したので、回収後これを変性させ、FAD 再生 buffer により再生後、Ni-NTA で精製した。分光測定においては、作製した乾燥フィルムに 1 μl の軽水または重水を添加し、水和フィルムの状態で実験を行った。試料を 260 K にセットし、青色光照射前後の赤外スペクトル変化を観測した。

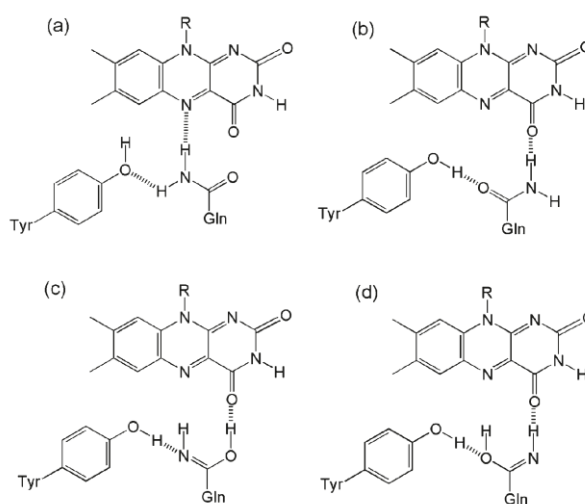


Figure 1 想定される BLUF ドメインの FAD, Tyr, Gln の構造

【結果・考察】

D₂O 水和した試料に対して、BLUF (負の信号) と BLUF_{red} (正の信号) における X-D 伸縮振動の変化を Figure 2 に示す。Tyr-D₄ 標識試料のスペクトルを非標識試料のものと比較したところ、BLUF で 2421 cm⁻¹、BLUF_{red} で 2029 cm⁻¹ のバンドに同位体効果が見出されたことから、これらを Tyr 側鎖の O-D 伸縮振動と帰属した。対応する O-H 伸縮振動は BLUF で 3292 cm⁻¹ に現れることから⁴、光活性化によって水素結合が異常に強くなる活性中心の Tyr は、暗状態においても水素結合を形成していることがわかった。

次に Gln の C=O、C=N 伸縮振動の帰属を行った。以前、Gln が光反応に伴ってケト型 (C=O) からエノール型 (C=N) に異性化が起こるのではないかという提案があった⁵。そのため、アポタンパク質のみを ¹³C 標識することで FAD 由来のシグナルとアポタンパク質由来のシグナルを分離した上でさらに、¹³C,¹⁵N 二重標識試料を測定した (Figure 3)。その結果 1641 cm⁻¹, 1624 cm⁻¹ のバンドがそれぞれ 5, 7 cm⁻¹ 低波数シフトした。このシフトは、Gln がエノール型に転移したことによる C=N 伸縮振動としては小さく、ケト型の C=O 伸縮振動が ¹⁵N 標識の影響を間接的に受けたものであると解釈した。また、Gln の標識試料の測定からもエノール型の C=N 伸縮振動は観測できなかった。よって光反応の前後で Gln はケト型の構造をしていると考えられる。さらにアポタンパク質だけを ¹⁵N 標識した試料と FAD も含めて ¹⁵N 標識した試料を比較することで FAD の ND 伸縮振動が BLUF で強い水素結合を形成しており、BLUF_{red} でさらに水素結合強度が強くなることがわかった。

本発表では ¹³C、¹⁵N、¹³C,¹⁵N、Tyr-D₄、Gln- α -¹⁵N などの標識試料の赤外スペクトルをもとに活性中心の水素結合構造変化に関するモデルを提示したい。

【引用文献】

1. Han, Y., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **33**, 12306-12311 (2004).
2. Yoshikawa, S., et al. *Photochem. Photobiol. Sci.* **101**, 727-731 (2005).
3. Gauden, M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **29**, 10895-10900 (2006).
4. Iwata, T., et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1015-1019 (2011).
5. Domratcheva, T., et al. *Biophys. J.* **94**, 3872-3879 (2008).

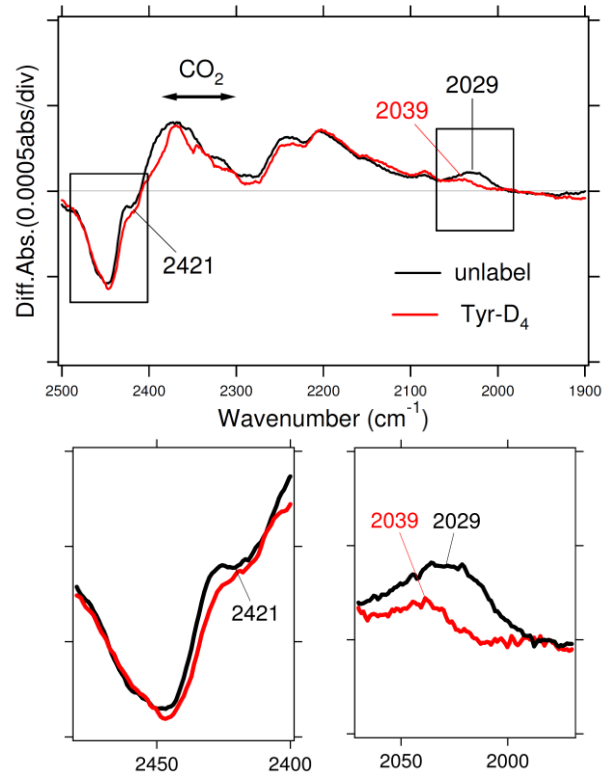


Figure 2 FTIR 差スペクトル X-D 伸縮振動領域

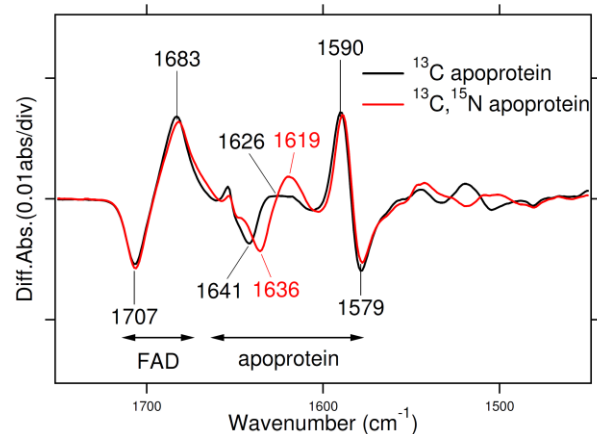


Figure 3 FTIR 差スペクトル C=O、C=N 伸縮振動領域