

水素結合強度変化による FixL のリン酸化活性制御機構

(阪大院・理¹, 理研・播磨²) ○山脇竹生¹, 石川春人¹, 水野操¹, 中村寛夫², 城宜嗣², 水谷泰久¹

A Role of Hydrogen Bond of Tyr201 in Kinase Regulation of Oxygen Sensor Protein FixL

(Osaka University¹, RIKEN HARIMA²) ○Takeo Yamawaki¹, Haruto Ishikawa¹, Misao Mizuno¹, Hiro Nakamura², Yoshitsugu Shiro², Yasuhisa Mizutani¹

序論 FixL は、マメ科植物と共生する根粒菌に含まれる酸素センサータンパク質で、細胞内酸素濃度を感知する。FixL はセンサードメインとキナーゼドメインから構成される。高酸素濃度下ではセンサードメイン内にあるヘムに酸素が結合し、センサードメインは構造変化を起こす。この変化がキナーゼドメインへと伝達することで、キナーゼドメインはリン酸化活性を抑制すると考えられている。しかし、キナーゼドメインの立体構造や、構造変化の情報はこれまで報告されていない。このため、酸素の結合・解離に伴う FixL の構造変化と活性制御の関係はよくわかっていない。

これまで私たちは FixL の構造変化と活性制御の関係を明らかにするため、野生型、および変異体 FixL の紫外共鳴ラマン測定とリン酸化活性測定を行ってきた。紫外共鳴ラマン測定の結果、センサードメインにあるアミノ酸番号 201 のチロシン残基 (Tyr201) が酸素の結合に伴って Y8a バンドの強度を増大させたことから、酸素の結合によって Tyr201 の水素結合強度が増加することを示唆した。また、リン酸化活性測定の結果、酸素の結合による Tyr201 の水素結合強度の増加は活性抑制に関わっていることを明らかにした¹。今回、酸素の脱離に伴う FixL の構造ダイナミクスを調べるため、リガンド分子の光解離を利用して時間分解紫外共鳴ラマン測定を行った。この結果から FixL の活性制御ダイナミクスを提案する。

実験 タンパク質試料は大腸菌発現したものをカラムクロマトグラフィーで精製した。時間分解共鳴ラマンスペクトル測定は、ポンプ光に波長 532 nm、プローブ光に波長 233 nm のパルス光をもちいて行った。Tyr201 に由来するスペクトルへの寄与を求めるため、Tyr201 の残基をフェニルアラニン (Phe) 残基に置換した変異体を作製した。

結果 図 1 に野生型 (WT) の酸素結合形 FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを示す。得られたスペクトルの強度は 934 cm^{-1} に現れる過塩素酸イオン由来のバンドを用いて規格化した。各スペクトルは光照射後各々の遅延時間で得たスペクトルから光照射前のスペクトルを等倍で引いたものである。光照射後 0.16–25 μs の間で Tyr 残基由来の Y7a, Y8a, Y9a バンドの強度が時間とともに減少していることがわかった。特に強度変化の大きい Y8a バンドの強度に着目し、光照射前 WT の Y8a バンド強度に対する、各遅延時間での Y8a バンドの強度変化の割合を計算し図 2 に●で示した。

酸素の解離に伴う WT の Y8a バンドの強度変化は 2 つの指数関数の和で記述でき、時定数はそれぞれ 0.21 μs 、3.6 μs であった。一方、Y201F 変異体の Y8a バンドの強度変化 (図 2, \blacktriangle) は、時定数 0.23 μs で減衰し、8.6 μs で増大が見られた。

考察 WT と変異体のどちらも Y8a バンドの強度に時定数約 0.2 μs の速い減衰がみられた。この減衰は酸素分子が光解離して生じたヘムポケット周辺の構造変化を反映していると考えられる。

変異体のスペクトルでは Tyr201 を Phe 残基に置換しているため、Tyr 残基由来のバンドに Tyr201 の寄与は含まれない。このことから、WT でみられた時定数 3.6 μs の減衰は Tyr201 に由来する変化であると考えられる。一方、Y201F 変異体は時定数 8.6 μs で増大しているが、これは Phe 残基が水素結合を形成できず、Tyr201 の水素結合を通じた構造変化の伝達起きないため、200 ns 以降は WT とは異なる構造変化が起きたことによると考えられる。

Hiruma らの時間分解可視共鳴ラマン分光法による先行研究²では、時定数約 1-2 μs でヘムの平面性が変化し、時定数 3.3 μs でヘムのプロピオン酸基が変化すると報告されている。図 2 に示す結晶構造では、Tyr201 が位置するヘリックスは His196 を介してヘムと結合している。したがって、酸素脱離に伴うヘムの構造変化は His196 を通じて Tyr201 に伝達すると思われる。さらに、FG ループはキナーゼドメインと相互作用すると予想されている部位であることから、Tyr201 の構造変化はループを通じてキナーゼドメインへと伝達されることが考えられる。この伝達は Tyr201 の水素結合の強度変化によって起こることが以前の我々の研究¹からわかっている。以上から、酸素脱離→ヘム→His196→Tyr201 の水素結合→ループ→キナーゼドメインと構造変化が伝達することで活性を制御するモデルを提案する。

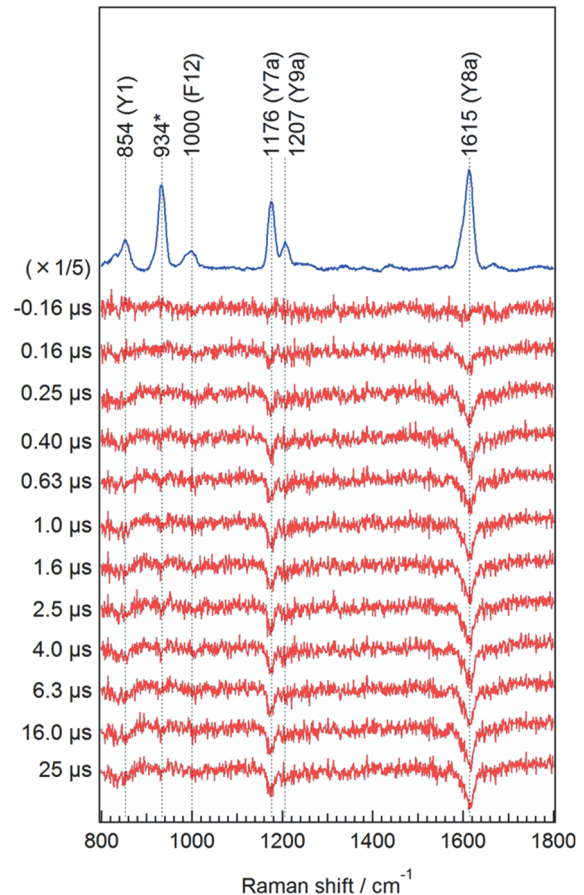


図 1: 酸素結合形 WT-FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。光解離後スペクトルから光解離反応前のスペクトルを引いた差スペクトルを示す。最上段には比較のため酸素結合形のスペクトルを載せた。

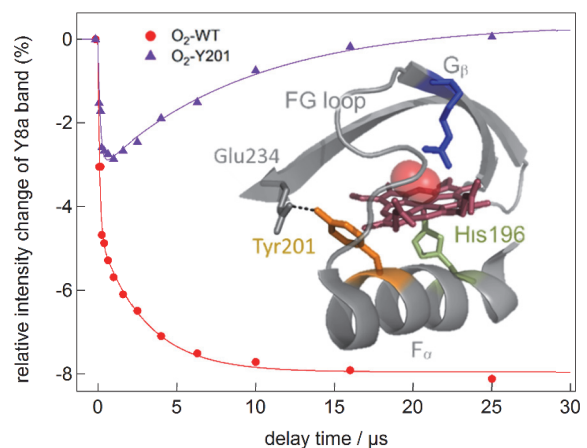


図 2: 酸素脱離に伴う WT および Y201F 変異体の Y8a バンド強度の時間変化。●: WT, ▲: Y201F 変異体。挿入図は構造既知のダイズ根粒菌由来の酸素結合形 FixL のセンサードメインの立体構造。F ヘリックスから H シートまでを示す。アミノ酸番号は本研究で用いたアルファルファ根粒菌由来の FixL に対応する番号を表示した。

- (1) 山脇他, 日本化学会第 94 春季年会 2014, 講演番号 2D2-45.
- (2) Hiruma, Y.; Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y. *Biochemistry* 2007, 46, 6086.