

酸素センサータンパク質 FixL のアロステリックダイナミクス

(阪大院・理¹, 理研・横浜², 兵庫県立大学³)○山脇竹生¹, 水野操¹, 石川春人¹, 中村寛夫², 城宜嗣³, 水谷泰久¹

Allosteric Dynamics of the Oxygen Sensor Protein FixL

(Osaka University¹, RIKEN Yokohama², University of Hyogo³) ○Takeo Yamawaki¹, MisaoMizuno¹, Haruto Ishikawa¹, Hiro Nakamura², Yoshitsugu Shiro³, 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。その立体構造は、センサードメインとリン酸化ドメインの 2 つのドメインから構成される。酸素濃度が高まると、センサードメインに含まれるヘムに酸素が結合し、センサードメインの構造変化が誘起される。そして、この構造変化がリン酸化ドメインへと伝達し、リン酸化ドメインのリン酸化活性が抑制されると考えられている。われわれは、構造変化と機能活性との相関をもとにして FixL の機能制御メカニズムを調べている¹。ドメイン間のアロステリックな構造変化による機能制御は興味深いが、FixL の立体構造や構造変化の情報がこれまでに報告されていなかったため、酸素の脱着に伴う FixL のアロステリックダイナミクスはわかっていなかった。本研究では、酸素の脱離に伴う FixL の構造ダイナミクスを時間分解共鳴ラマン測定によってとらえ、ドメイン間のアロステリックな構造変化を明らかにした。

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 のパルス光を用いて行った。ポンプ光、プローブ光ともにパルス幅は約 20 ns であった。

結果 酸素のヘムからの脱離に伴う野生型 (WT) FixL の構造変化を調べるため、酸素の光解離に伴う時間分解紫外共鳴ラマンスペクトルを観測した。スペクトル変化を詳しく調べるため、生の時間分解スペクトルからプローブ光のみを照射して得たスペクトルを引いた差スペクトルを計算した。このとき、934 cm^{-1} に観測された過塩素酸イオン由来のバンドを用いて自己吸収の効果を補正した。計算された差スペクトルを図 1 に示す。酸素脱離後 0.16–25 μs の間でチロシン (Tyr) 残基由来の Y1, Y7a, Y8a, Y9a バンドの強度が時間とともに減少した。

WT で観測された Tyr 残基由来のバンド強度変化について、FixL に含まれる複数の Tyr 残基のうち、各 Tyr 残基の成分を次のようにして求めた。特定の Tyr をフェニルアラニン (Phe) 残基に置換することで、その Tyr 残基のスペクトルへの寄与を除くことができる。Tyr 残基の置換が、タンパク質の立体構造およびダイナミクスに影響を及ぼさないと仮定すると、WT のスペクトルと、Tyr を Phe 残

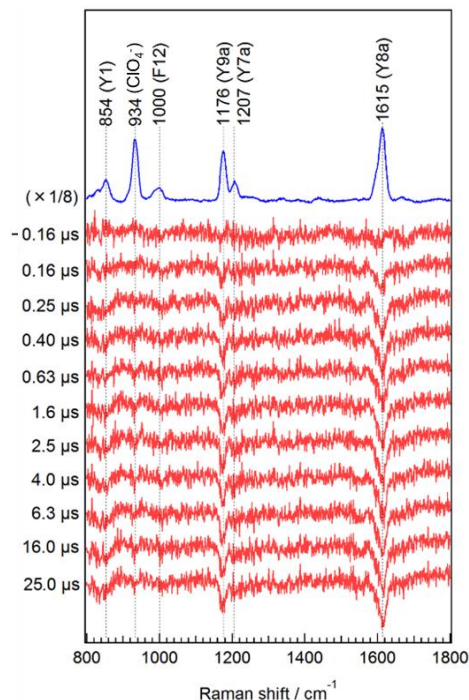


図 1: 酸素結合形 WT-FixL の時間分解紫外共鳴ラマンスペクトル。生の時間分解スペクトルからプローブ光のみを照射して得たスペクトルを引いた差スペクトルを赤で示す。比較のため酸素結合形のスペクトルを青で示す。

基に置換した変異体のスペクトルとを比較することで、スペクトル中に含まれる個々の Tyr 残基の成分を計算することができる。アミノ酸置換による立体構造の変化を最小限にするため、アミノ酸置換は特定の Tyr 残基 1 カ所のみとし、さらに、置換によってリン酸化活性が失われないことをリン酸化活性測定により確認した。

センサードメインに含まれる Tyr201 残基のスペクトル変化を解析した結果を図 2 に示す。WT で強度変化の大きかった Y8a バンドに着目し、酸素結合形におけるバンド強度に対する、差スペクトルのバンド強度の比を計算した。それを■で示す。また、Y201F 変異体についての強度比を▲で示す。●は両者の差で、Tyr201 の成分を表している。Tyr201 の成分は、装置応答時間 (約 50 ns) 内の強度変化と、時定数 $5.2 \pm 0.4 \mu\text{s}$ の指数関数的変化でよく表された (実線)。この他に、センサードメインに含まれる Tyr190、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297、Tyr379、Tyr496 の成分を同様に解析した。いずれも一成分の指数関数的変化を示した (表 1)。

考察 センサードメインのみのタンパク質についての時間分解紫外共鳴ラマン分光法の研究では、主として Tyr201 の寄与を反映した Y8a バンドの強度減少が観測され、その時定数は約 $0.1 \mu\text{s}$ であることが報告されている³。今回観測した、リン酸化ドメインも含むタンパク質では、それより 1 桁大きな約 $5 \mu\text{s}$ の時定数の強度減少がみられた。このことは、リン酸化ドメインが、センサードメインの動きに影響を与えていることを示している。

また、時間分解可視共鳴ラマン分光法でヘムおよびヘム周辺の構造を調べた研究²では、センサードメインのみの場合、時定数 $0.2-0.3 \mu\text{s}$ 、リン酸化ドメインも含む場合、時定数 $1-3 \mu\text{s}$ の変化が観測されており、今回観測された時定数とほぼ整合している。このことは、ヘムと Tyr201 周辺の構造変化が連動していることを示唆する。

表 1 をみると、センサードメインに含まれる Tyr190 および Tyr201、リン酸化ドメインに含まれる Tyr297 および Tyr379 の変化の時定数はどれもマイクロ秒のオーダーであることがわかる。上に述べたようにヘムの構造変化は時定数 $1-3 \mu\text{s}$ の成分を持つことから、FixL において、酸素の脱離に伴って、ヘム、センサードメインおよびリン酸化ドメインの一部 (Tyr297 と Tyr379 の周辺構造) は、ほぼ一体となって構造変化を起こすことが示唆される。これは、リン酸化ドメインの有無によってセンサードメインの構造変化の速さが影響を受けることも整合する。一方、Tyr496 が 10 マイクロ秒のオーダーで変化していることから、ヘムの構造変化と連動したタンパク質構造の変化のうち、リン酸化ドメインにはさらに構造変化が起きることがわかった。

以上のように、各 Tyr 残基に由来するスペクトルの成分を求めることで、ドメイン間に互いに連動した構造変化があることを明らかにした。このようなドメイン間の連動した構造変化は FixL の機能制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

(1) Yamawaki, T.; Ishikawa, H.; Mizuno, M.; Nakamura, H.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *Biochemistry* **2016**, 55, 4035. (2) Hiruma, Y.; Kikuchi, A.; Tanaka, A.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *Biochemistry* **2007**, 46, 6086. (3) Yano, S.; Ishikawa, H.; Mizuno, M.; Nakamura, H.; Shiro, Y.; Mizutani, Y., *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 15786.

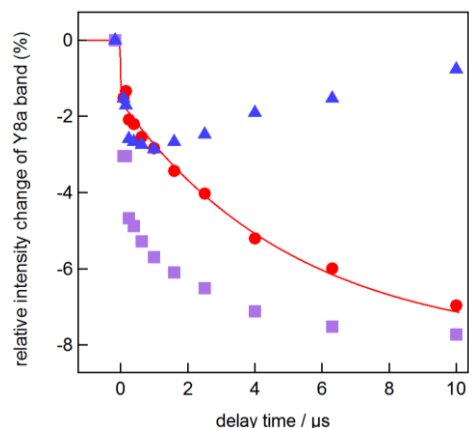


図 2: 酸素脱離に伴う WT-FixL (■)、Y201F 変異体 (▲) の Y8a バンド強度の時間変化。WT から Y201F の強度を引いて計算した強度 (●) を Tyr201 の成分と考えた。

表 1: 各 Tyr 残基のスペクトル変化の時定数

| | | 時定数 / μs |
|----------|--------|---------------------|
| センサードメイン | Tyr190 | 2.8 ± 0.2 |
| | Tyr201 | 5.2 ± 0.4 |
| リン酸化ドメイン | Tyr297 | 1.6 ± 0.4 |
| | Tyr379 | 2.6 ± 0.4 |
| | Tyr496 | 20.1 ± 11.4 |