

## 青色光センサータンパク質PixDの分子機能におけるC末端領域の重要性

京大院理

○床次俊郎, 中曾根祐介, 寺嶋正秀

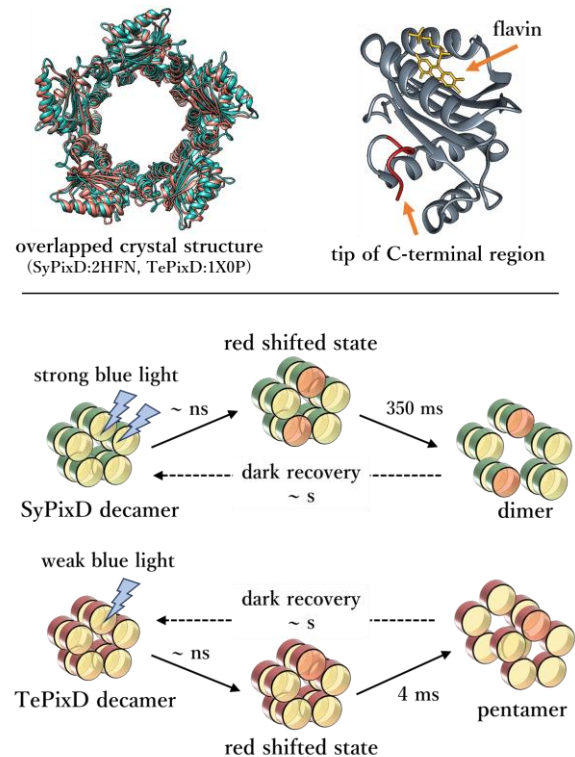
### The importance of C-terminal region on the molecular function of blue light sensor protein PixD

○Shunrou Tokonami, Yusuke Nakasone, Masahide Terazima

*Department of Chemistry, Kyoto University, Japan*

**【Abstract】** Bacterial blue light sensor BLUF proteins, SyPixD and TePixD, have highly similar decamer structures in crystal. However, they show distinct photoreaction. SyPixD dissociates into the dimer under high fluence of light irradiation, while TePixD dissociates into the pentamer under weak light condition. In order to understand the molecular mechanism underlying the difference, we focus on the C-terminal region of the BLUF domain. Since this region is considered to be important for signal transduction and shows no similarity in amino acid sequence among various BLUF proteins, it might be a key factor determining the diversity of the reaction. We investigated the photoreaction dynamics of several C-terminal truncated mutants of SyPixD using the transient grating method and revealed that the C-terminal region indeed affects the oligomeric state and light response at the molecular level.

**【序】** PixD は、発色団にフラビン色素を有する青色光センサー-BLUF(sensor of Blue Light Using Flavin)タンパク質ファミリーの 1 つで、生体内ではシアノバクテリアが持つ、走光性におけるシグナル伝達初期過程の制御を担っている。PixD には、*Synechocystis* 由来の SyPixD と *Thermosynechococcus elongatus* 由来の TePixD の 2 種が知られており、共に非常に類似した 10 量体構造を有している (Fig.1 左上)。しかし、面白いことに SyPixD と TePixD は全く異なる光反応ダイナミクスを示す (Fig.1 下)。SyPixD は強青色光で励起されると、まずフラビン由来の吸収スペクトルがレッドシフトした状態に至り (BLUF タンパク質共通の反応)、その後 10 量体が 2 量体へ解離する [1]。一方 TePixD は、弱青色光でレッドシフト状態に至り、10 量体から 5 量体に解離する [2]。2 つのアミノ酸配列を比較すると、フラビンを保持する光センサードメインには相同性があるが、C 末端領域には相同性



**Fig. 1.** Structure (upper) and photoreaction schemes (lower) of PixDs

がないため、2つの違いはC末端領域に起因する可能性がある。特に SyPixD は TePixD よりも C 末端の先端領域が 7 残基だけ短い(Fig1.右上)。そこで本研究では、SyPixD の C 末端を 7 残基除去した変異体(SyC7d)を作製し、PixD の光誘起解離反応に C 末端領域が及ぼす影響を調べた。光反応の検出には、反応前後の分子の拡散係数変化を検出できる分光手法、過渡回折格子(TG)法を用いた。

**【実験】** PixD の野生型や変異体のサンプルは、大腸菌を用いた発現系により大量発現し、HisTrap 精製を行った。TG 測定では、462 nm の色素レーザーを励起パルス光に、830 nm の CW ダイオードレーザーをプローブ光に使い、サンプルから出た回折光を赤外光用 PMT で検出した。

**【結果・考察】** Figure2 に SyPixD の WT と C7d 変異体それぞれの暗状態と光状態の吸収スペクトルを示した。変異体でも WT 同様のレッドシフトが起こっていることから、変異後も発色団周辺の環境が保たれていることを確認した。

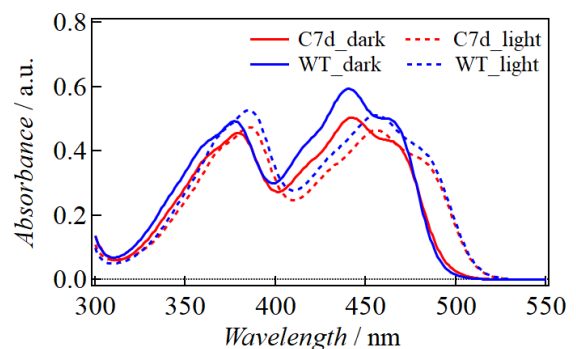
Figure3 に SyPixD の WT と C7d 変異体の TG 信号を示した。山型の信号は、光反応によって分子に拡散係数変化が生じたことを示す信号であり、先行研究から、WT では 10 量体から 2 量体への解離を表していることが分かっている[1]。一方、C7d 変異体では信号が大きく変化した。すなわち、分子拡散信号が速い時間領域へとシフトしており、これは反応物の拡散係数が WT よりも大きく、より小さな会合状態を形成していることを示唆している。詳細に解析を行ったところ、C7d では光反応物と生成物の拡散係数が、それぞれ  $D_R=7.2 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $D_P=8.7 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  であった。WT の光生成物の 2 量体の拡散係数  $D_P=7.5 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$  と非常に良い一致を示すことから、C7d では 2 量体の構造変化が光誘起されていることが示唆された。また、サイズ排除クロマトグラフィや Native-PAGE でも、分子量から 2 量体であることを確認した。

さらに、7 残基だけではなく、5, 3, 1 残基を除去した変異体でも 2 量体を支持する結果が得られており、C 末端を 1 残基でも除去すると、PixD の特異な 10 量体構造形成に影響があることが明らかになった。

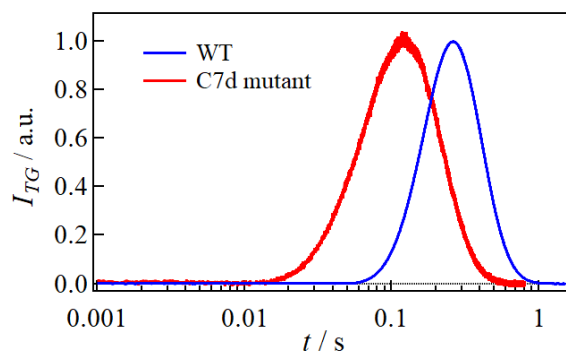
これまでの研究から、SyPixD は 10 量体構造を持つことで初めて、下流分子 SyPixE と相互作用が可能になり、走光性のシグナル伝達が発現すると考えられている。本結果は、一見不必要な、光センサードメインから離れた C 末端領域の先端部位が、PixD の 10 量体構造の維持に必要な要素であり、分子機能発現のためには欠くことができない要素であることを示唆している。現在、C 末端に置換、付加を施した変異体の測定も行っており、講演ではそれらの結果も踏まえ、PixD の分子機能に関わる C 末端の役割を議論する。

**【参考文献】** [1] K. Tanaka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 409, pp.773-785 (2011).

[2] K. Tanaka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 386, pp.1290-1300 (2009).



**Fig. 2.** Absorption spectra under dark and light condition of WT and C7d mutant



**Fig. 3.** TG signals of WT and C7d mutant (normalized at peak intensity)