

フラビンを色素として持つ新規青色光受容体の光反応機構の解明

Studies for elucidating the photocycle mechanism of the novel flavin-based blue-light photoreceptor

(日本植物生理学会推薦)

代表研究者 東京工業大学 増田 真二 Tokyo Institute of Technology Shinji MASUDA

Recently, a novel flavin-based photoreceptor AppA was identified that controls photosynthetic gene expression in response to both redox state and blue-light intensity in the purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Its flavin-binding domain, designated BLUF, have been found on the genome sequences from many eukaryotic and prokaryotic microorganisms. The photocycle reaction mechanism of BLUF is unique in the sense that a few hydrogen bond re-arrangements are accompanied with slight structural changes of bound chromophore. In this study, we show that the conserved Gln and Trp residues in the BLUF domain are crucial for the photocycle reaction. Specifically, both Q63L and W104A mutant AppA are locked in the light-signaling state *in vivo* and *in vitro*. Based on the crystal structures as well as spectroscopic data from several BLUF-containing proteins, we conclude that the light-dependent formation/breakage of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 is crucial for conversion of blue-light signal into specific apo-protein structural changes to control its anti-repressor activity.

1. 研究目的

近年フラビンを発色団として持つ新規の青色光受容体が紅色光合成細菌より発見された。BLUFと名付けられたこのタンパク質のフラビン結合ドメインは、原核および真核微生物に幅広く保存されていることがわかり、それらは光障害応答に関与する光受容体と考えられている。BLUFの光反応時に示す可視光吸収スペクトル変化は特徴的であることから、今まで知られていた光受容体とは異なる特異な機構で光情報変換を行うと考えられている。しかしながらその機構の詳細は明らかではない。本研究課題では、数種のBLUFタンパク質の分光学的解析、生化学的解析および生理学的解析を組み合わせ、この新規の光反応機構を解明することを目指した。

2. 研究経過

2-1. 結晶構造解析

シアノバクテリアの BLUF タンパク質である Slr1694 の結晶構造解析を行った。得られた構造では、光反応時に重要な役割を果たすと考えられるフラビン結合領域近傍の保存された Gln と Trp の側鎖の位置がサブユニット間で異なっていた。特に Trp は、一方のサブユニットでは色素近傍に、もう一方のサブユニットでは遠ざかるように位置していた。現在までに数種の BLUF ドメインの結晶構造が他の研究グループにより明らかにされているが、それらは Trp の位置が Slr1694 の二つのサブユニット構造のどちらかにより近い。このことからこの Trp の位置が光反応時にこの2つの位置を移動すると考えられた。しかしながらそのどちらが暗状態(もしくは明状態)での構造なのかに関して、結晶構造解析からでは明らかにすることはできなかった。また得られた結晶の分解能では Gln の側鎖の向きも明らかにすることはできなかった。

2-2. 分光学的解析

紅色光合成細菌の BLUF タンパク質 AppA の色素近傍に保存された Gln を Lue に変えた変異タンパク質 (Q63L) をラマン分光法により解析した結果、結晶構造解析からでは明らかにできなかった Gln 側鎖の向きを決定することができた。この構造では、Gln 側鎖のカルボニル基とフラビンは水素結合を形成しておらず、逆に保存された Trp (Trp104) と水素結合を形成していると考えられた。そこで Trp 由来の蛍光スペクトルを明暗両状態のタンパク質において測定したところ、フラビン近傍の Trp は光照射により親水性の環境に露出すると考えられた。このことから光照射により Trp と Gln の水素結合が切れ、結果 Trp の位置がフラビンから遠ざかると考えられた。

上記仮説を検証するため、この Trp を Ala に変えた変異タンパク質 (W104A) の光依存的構造変化を赤外分光法 (FTIR) により調べた。その結果、野生型のタンパク質において観測される光依存的なベータシートの構造変化が、W104A 変異に伴い消失することがわかった。この結果は上記の仮説を支持する。また光照射に伴い、フラビン環 C4=O 伸縮運動が弱くなることがわかり、このことから光依存的に Gln63 の側鎖の反転が引き起こされフラビン環 C4=O との間に新たな水素結合が形成されることが考えられた。量子化学計算よりこの水素結合の形成がフラビンの可視光吸収スペクトル変化を引き起こすと考えられた。

2-3. 生理学的解析

上記分光測定の結果を検証する為に、AppA の Q63L 変異および W104A 変異を紅色光

合成細菌のゲノムに導入し、その変異株の表現型を調べた。野生株において光合成色素の合成は青色光照射により抑制される。しかしながら Q63L および W104A 変異株いずれも青色光照射の有無にかかわらず、常に色素の合成が抑制されていることがわかった。このことは Q63L および W104A 変異 AppA はシグナリング状態に固定されていることを示している。

これらの結果から BLUF に光があたると、1) Gln の側鎖の反転が起き、2) フラビン環 C4=O へ水素結合が形成され、3) Trp104 がフラビンから遠ざかるように移動することで光シグナルをタンパク質の構造情報へ変換していることがわかった。また生理学的解析結果から Gln63 の側鎖とフラビン環 C4=O との間の水素結合は、シグナリング状態の形成に必須では無いことがわかった。一方、Q63L と W104A 変異株の表現型が似ていることから、暗状態に置ける Gln と Trp との水素結合は BLUF を不活性型に保つのに必須であると考えられた。

3. 考察

本研究課題遂行により、今まで未知であった BLUF タンパク質の光反応機構の詳細が明らかとなってきた。BLUF は色素の大きな構造変化を伴わずに水素結合ネットワークの変化を引き起こすことで光シグナル伝達を行う。この点が他の光受容体の光反応とは異なる大きな特徴である。しかしながらどのように水素結合のネットワークを光依存的に変化させるのか、またどのようなタンパク質構造を下流の因子は認識しているのか、等に関してはわかっていない。今後も様々な分析手法を組み合わせることでそれらの点が明らかになっていくと思われる。

4. 研究発表

口頭発表

1. 増田真二;「紅色光合成細菌 AppA はどのようにして光情報をシグナルに換えるのか」、第 47 回日本植物生理学会年会 (筑波、2006)
2. 増田真二;「酸素と光で制御されるバクテリア型光合成装置形成機構」、日本光合成研究会公開シンポジウム (横浜、2006)
3. 増田真二;「紅色細菌に見るレドックスと光シグナルの受容と伝達の分子メカニズム」、第 33 回生体分子科学討論会 (名古屋、2006)
4. Masuda, S. Hasegawa, K., Unno, M., Yamauchi, S., Ono, T. and Takamiya, K. 「Molecular basis of blue-light signalling via protein structural changes in AppA」 12th international symposium on photosynthetic prokaryotes (France, 2006)

5. 増田真二 ; 「青色光受容体 BLUF タンパク質の光反応と機能」、特定領域研究 LOV 光受容体による植物の運動制御機構 第一回若手ワークショップ (京都、2007)
6. 富田祥之、増田真二、太田啓之、高宮建一郎 ; 「紅色細菌の青色光受容 BLUF タンパク質 AppA の W104A 変異体はシグナリング状態に固定される」第 48 回日本植物生理学会年会 (愛媛、2007)

誌上発表

1. Hua Yuan, Spencer Anderson, Shinji Masuda, Vladimira Dragnea, Keith Moffat, and Carl E. Bauer; “Crystal structures of the *Synechocystis* photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling.” *Biochemistry* 45, 12687-12694 (2006).
2. Masashi Unno, Shinji Masuda, Taka-aki Ono, and Seigo Yamauchi; “Orientation of a key Glutamine residue in the BLUF domain from AppA revealed by mutagenesis, spectroscopy, and quantum chemical calculations.” *J. Am. Chem. Soc.* 128, 5638-5639 (2006).
3. Shinji Masuda, Toshiyuki Tomida, Hiroyuki Ohta, and Ken-ichiro Takamiya; “The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity.” *J. Mol. Biol.* in press.
4. Young-Ho Chung, Shinji Masuda, and Carl E. Bauer; “Purification and reconstitution of PYP-phytochrome (Ppr) with biliverdin and 4-hydroxycinnamic acid.” *Methods Enzymol.* in press.
5. Gabriele Klug, and Shinji Masuda; “Regulation of genes by light.” *In The Purple Photosynthetic Bacteria*, Eds. Hunter, C. N., Daldal, F., Thurnauer, M. C. and Beatty J. T., Kluwer Academic Publishers, in press.