

大阪大学グループ
(グループリーダー：水谷 泰久)

水素結合強度変化によるFixLのリン酸化活性制御機構

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

阪大院理¹, 理研播磨²

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。各スペクトルは照射後各々の遅延時間で得たスペクトルから照射前のスペクトルを等倍で引いたものである。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、照射前 FixL 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が起こらないため、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に示す結晶構造から、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ことがわかる。従って、酸素脱離に伴うヘムの構造変化はHis196を通じてTyr201に伝達すると考えられる。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。

【参考文献】

- [1] 山脇ら, 日本化学会第94春季年会 2014, 講演番号 2D2-45.
 [2] Hiruma et al. *Biochemistry* 2007, 46, 6086.

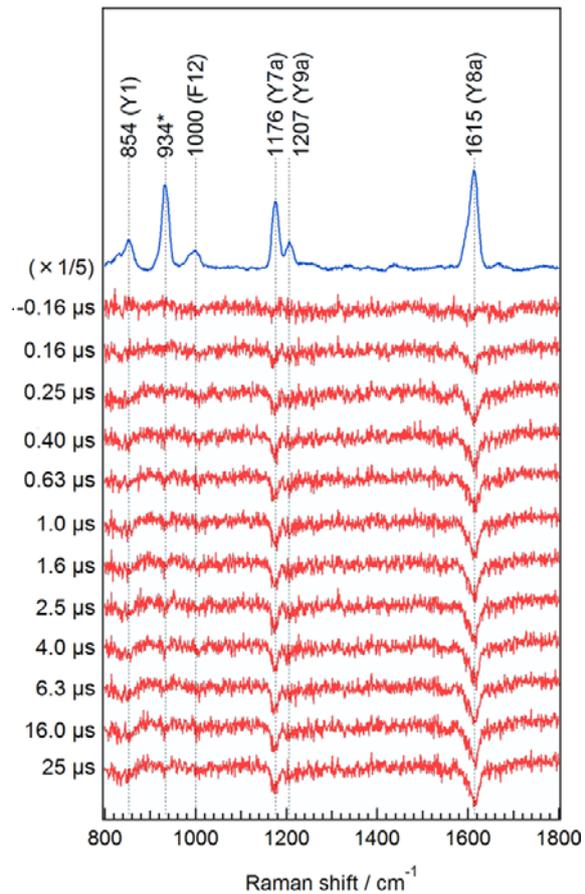


図1: 酸素結合形 WT-FixL の時間分解紫外共鳴ラマン分光法によるスペクトル。光解離後スペクトルから光解離反応前のスペクトルを引いた差スペクトルを示す。最上段には比較のため酸素結合形のスペクトルを載せた。

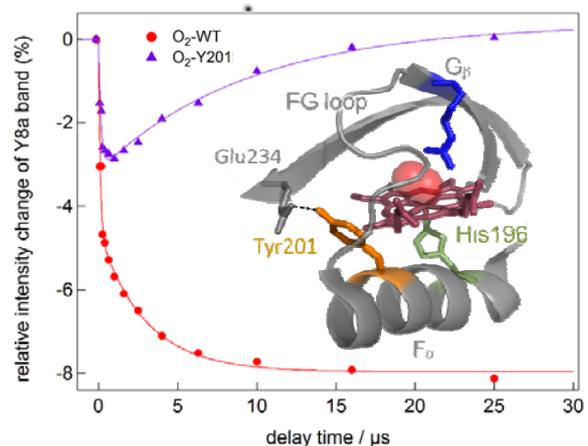


図2: 酸素脱離に伴うWTおよびY201F変異体のY8aバンド強度の時間変化。●: WT, ▲: Y201F変異体。挿入図は構造既知のダイズ根粒菌由来の酸素結合形FixLのセンサードメインの立体構造。FヘリックスからHシートまでを示す。アミノ酸番号は本研究で用いたアルファルファ根粒菌由来のFixLに対応する番号を表示した。

グロイオバクターロドプシン K中間体における発色団とプロトンドナーの長距離カップリング

及川 健太郎¹, 水野 操¹, 神取 秀樹², 水谷 泰久¹

阪大院理¹, 名工大院工²

序論 グロイオバクターロドプシン (GR) は真正細菌シアノバクテリア由来の微生物型ロドプシンである。GR はバクテリオロドプシン (BR) と同様に光駆動プロトンポンプ機能を有している。GR は光を吸収すると、複数の中間体を経て始状態へと戻る (GR→K→L→M→N→O→GR) [1]。この光サイクル中の M 中間体では、レチナール発色団のシッフ塩基が脱プロトン化しており、N 中間体でシッフ塩基が再プロトン化される[2]。この再プロトン化のためのプロトンドナーは 132 番目のグルタミン酸(Glu132)だと考えられている。低温でトラップした K 中間体の FTIR スペクトルから、K 中間体生成に伴い、Glu132 が形成する水素結合の強度が変化することが報告されている[3]。このようなプロトンドナーの変化は、他の微生物型ロドプシンでは見られない。Glu132 の挙動を明らかにすることは GR のプロトンポンプ機能を理解する上で重要である。本研究では野生型 GR、および Glu132 をアスパラギン酸に置換した E132D 変異体について、室温における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果、GR では K 中間体の生成に伴い、レチナール発色団と Glu132 との間に長距離相互作用が形成されることがわかった。

実験 野生型 GR および E132D 変異体は、大腸菌に発現させ、可溶化したのちにカラムクロマトグラフィーで精製したものをを用いた (pH 9)。レーザー光の強度変化を利用した中間体測定には、Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns) をを用いた。時間分解共鳴ラマン測定においては、ポンプ光に Nd:YAG レーザーの第二高調波 (532 nm, 20 ns)、プローブ光には Ti:Sapphire レーザーの第二高調波 (475 nm, 40 ns) をを用いた。

結果および考察 図 1 に、野生型および E132D 変異体における GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトルを示す。野生型と変異体のスペクトルを比較すると、いずれの状態においてもスペクトルはよく似ていることが分かった。ここで、1620–1650 cm⁻¹付近に観測される C=N 伸縮振動バンドに注目する。C=N 伸縮振動モードは、N–H 変角振動とカップルしており、レチナールシッフ塩基の水素結合強度の良いマーカーバンドである。シッフ塩基の水素結合が強い場合、C=N 伸縮振動バンドはより高波数側に現れ、大きな重水素シフトを示すことが知られている[4]。図 2A, B および C はそれぞれ、GR、K および L 中間体の C=N 伸縮振動バンドの拡大図である。図 2A および B を見ると、C=N 伸縮振動バンドは GR では完全に一致しているが、K 中間体では野生型の方が低波数側に現れた。これは、野生型と E132D 変異体のシッフ塩基の水素結合強度は、始状態では差がないのに対し、K 中間体では差があることを意味する。すなわち、レチナールシッフ塩基と Glu132 が、K 中間体生成に伴って相互作用を形成することを示している。シッフ塩基と Glu132 とは 10 Å 以上離れているにもかかわらず、このような相互作用が生じることは興味深い。

また図 2C に示すように、L 中間体においても、C=N 伸縮振動バンドは野生型と変異体との間で波数に差が見られた。したがって、K 中間体生成時に生じた相互作用は L 中間体においても維持されていると考えられる。

以上から、GR では K および L 中間体において、レチナルシッフ塩基と Glu132 が相互作用を形成していることが分かった。Glu132 は N 中間体生成時において、シッフ塩基にプロトンを供与すると考えられている。本研究の結果は、それよりも早い段階で Glu132 とシッフ塩基との間に相互作用が形成されていることを示している。このような長距離相互作用は、M 中間体に対するシッフ塩基の再プロトン化を促進し、光サイクル全体のターンオーバーの速度を速めていると考えられる。

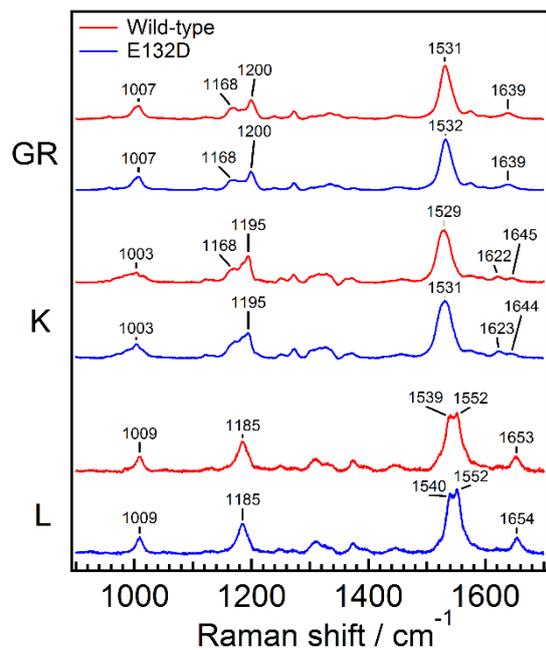


図 1. 野生型 (赤) および E132D 変異体 (青) における、GR の始状態、K および L 中間体の共鳴ラマンスペクトル

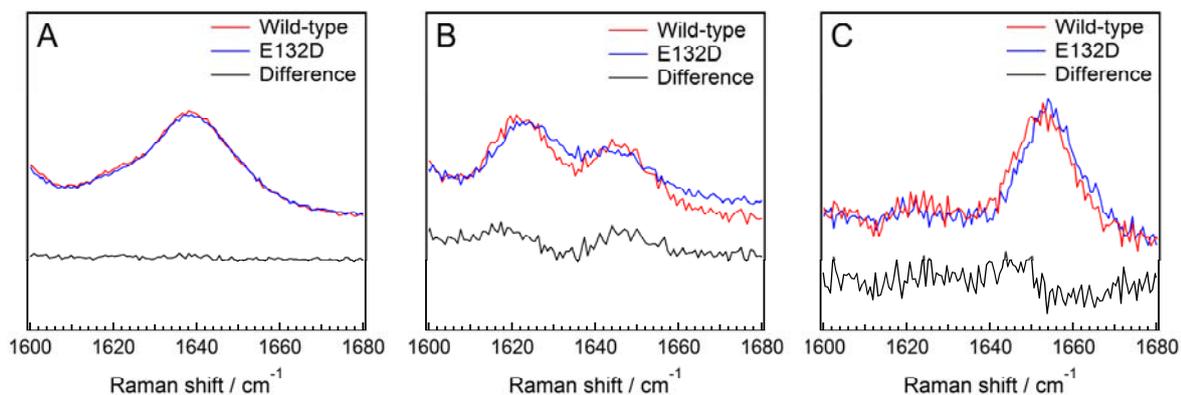


図 2. GR のラマンスペクトルの 1600–1680 cm^{-1} 領域を拡大したもの。(A) 始状態、(B) K 中間体、(C) L 中間体

【参考文献】

- [1] Miranda, et al., *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1471.
- [2] 中嶋ら, 第 9 回分子科学討論会 2015, 講演番号 4C09.
- [3] Hashimoto, et al., *Biochemistry* **2010**, *49*, 3343.
- [4] Smith, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3108.