

令和元年6月6日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07318

研究課題名(和文)光センサータンパク質における特異な水素結合構造の解明

研究課題名(英文) Unique hydrogen-bonding environments in photosensor proteins

研究代表者

岩田 達也 (IWATA, Tatsuya)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：20569917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ビタミンB2誘導体であるフラビンを光センサーのアンテナとして結合した光センサータンパク質を対象として、フラビンやアミノ酸側鎖の特異な水素結合環境の形成について赤外分光解析を行った。LOVドメインではフラビンのNH基が極めて強い水素結合を形成していることを観測し、これが、フラビンとタンパク質の結合に関与していることを明らかにした。また、BLUFドメインでは光反応中間体チロシン残基のOH基が形成する強い水素結合について、その受容基はエノール型に異性化したグルタミン残基の窒素原子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、赤外分光法を用いてタンパク質中の強い水素結合を形成した化学結合の検出に成功しました。水素結合はタンパク質の構造形成や基質認識や酵素反応に重要な役割を果たしていると考えられますが、それを検出できる系というのは限られています。本研究で発見したことは、光センサータンパク質の光反応を測定することによって、LOVドメインではタンパク質と補酵素の結合で恒常的に強い水素結合を形成すること、またBLUFドメインでは光反応中間体で強い水素結合を形成することを見出しました。今後、適切にな測定系の開発により、多くのタンパク質の構造形成や反応に重要な水素結合の検出への足がかりになるものと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Formation of specific hydrogen bonds was detected by infrared spectroscopy on blue-light receptor domains, LOV and BLUF, that binds flavin as chromophore.

I found the NH group of flavin forms quite strong hydrogen bond with side chains of apoprotein in LOV domain. Flavin must bind into the LOV apoprotein by such a strong interaction. For the BLUF domain, we have found quite strong hydrogen bond of the OH group of Tyr side chain, and the partner was a nitrogen atom of enol form of Gln side chain.

研究分野：生物物理学

キーワード：フラビン 光センサータンパク質 フーリエ変換赤外分光法 安定同位体標識 質量分析法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紅色光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* の青色光受容体の AppA のフラビン結合青色光センサードメインである BLUF を対象とした FTIR 分光解析により、光反応に必須のチロシン側鎖の O-H 基伸縮振動を $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ に検出した (Iwata, T. et al. (2012) *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1015-1019, 図 1)。このことは、BLUF ドメインのチロシンが中間体で極めて強い水素結合を形成していることを意味している。チロシンの周囲には電荷が存在せず、どのような構造で異常に強い水素結合を形成するのか極めて興味深い。現在までに様々なモデルが立てられているが、まだ水素結合構造の確定には至っていない (研究計画・方法の図 3 を参照)。チロシンと水素結合を形成しているグルタミンの構造をグルタミンの同位体標識体を計測することにより明らかにし、チロシンの O-H 伸縮振動が $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ に現れるときの構造を明らかにする必要があると考えた。

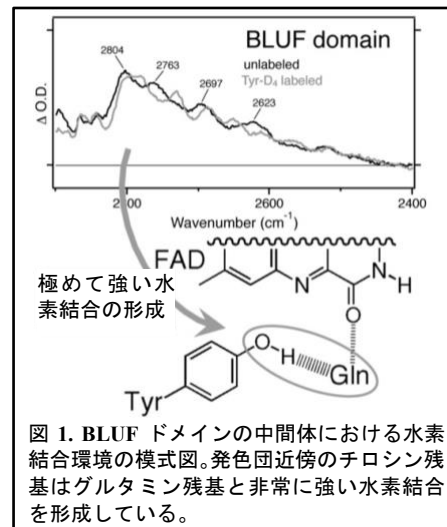


図 1. BLUF ドメインの中間体における水素結合環境の模式図。発色団近傍のチロシン残基はグルタミン残基と非常に強い水素結合を形成している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、フラビンを発色団として結合した青色光受容体タンパク質である BLUF ドメインを対象として異常に強い水素結合を形成した水素結合供与基の構造とそのタンパク質における水素結合の役割を明らかにすることとした。私は、本研究開始までに BLUF ドメインのフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光計測の結果、発色団近傍のアミノ酸残基の O-H 基が強い水素結合を形成することを明らかにした (「1. 研究当初の背景」参照)。

これまでに、視覚ロドプシンや微生物型ロドプシンに対する FTIR 分光計測の結果、発色団レチナールのプロトン化シッフ塩基の N-H 基やその近傍の水分子の O-H 基が強い水素結合を形成しており、水素結合強度と機能発現に関連があると報告されている。このことより、BLUF ドメインにおける特異な水素結合構造を明らかにし、機能発現における役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究の対象とする光センサータンパク質は大腸菌の大量発現系にて調製をおこなった。安定同位体標識試料については、大腸菌培養用培地に合成培地を使用し、タンパク質および発色団フラビンの ^{15}N 、 ^{13}C 標識のためにそれぞれ ^{15}N -塩化アンモニウム、 ^{13}C グルコースを添加した培地を加えた。 ^{15}N -グルタミンと重水素化チロシン (Tyr-D₄) 標識には、合成培地に ^{15}N -Gln 或いは Tyr-D₄ を添加した。

FTIR 分光法のために、フッ化バリウムの窓板上でタンパク質溶液を乾燥させ、測定時に少量の水 (軽水、重水) を試料の側に置いて密閉し、飽和蒸気圧にてタンパク質を湿らせた。試料を 260 K にセットして 400–500 nm 光を試料に照射し、照射前後の FTIR 差スペクトルの計測をおこなった。

4. 研究成果

(1) フラビンを発色団として結合した BLUF ドメインは光反応の前後で発色団フラビンの吸収極大が $\sim 10\text{ nm}$ 長波長シフトするがこの変化は発色団の化学構造の変化によるものではない。発色団の C=O 基の水素結合が強くなったことに対応すると考えられている。BLUF ドメインのこの光反応には発色団近傍のグルタミン残基とチロシン残基が必須である (図 2)。我々が以前に報告した光反応中間体で強い水素結合を形成するチロシン残基とはこの発色団近傍のチロシン残基である。

この光反応について、他のグループから近傍のグルタミンの側鎖のケト形がエノール型への互変異性が起きている可能性が示されていた (Stelling et al., 2007)。そして、私が BLUF 研究に携わっている間にそれが実証されたとの報告がなされた (Domratcheva et al., 2016)。彼女たちは、安定同位体標識し

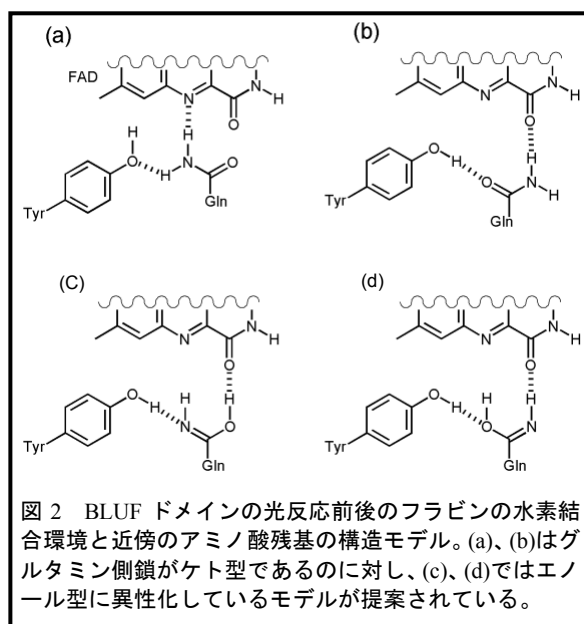


図 2 BLUF ドメインの光反応前後のフラビンの水素結合環境と近傍のアミノ酸残基の構造モデル。(a)、(b)はグルタミン側鎖がケト型であるのに対し、(c)、(d)ではエノール型に異性化しているモデルが提案されている。

た BLUF ドメインの FTIR 分光解析と密度汎関数理論による計算によって、中間体でのグルタミン側鎖の異性化を検出したと主張した。ここで、中間体で強い水素結合を形成するチロシンの O-H 基の水素結合受容体はエノール型グルタミンの窒素原子であり、窒素原子の非共有電子対が強い水素結合を形成する原因であると議論した。

我々がその時おこなっていた測定は正に彼女たちと同じであったため、発表を先行されたことに落胆した。しかしながら、彼女たちの FTIR スペクトルの形は、我々がその時点で得ていたスペクトルとは大きく異なっているように見えた。彼女たちと我々は異なる生物種由来の BLUF ドメインを使用していたとは言え、看過できる差ではなかった。この差違がどこから生じるのかを研究することで BLUF ドメインの環境 (の違い) を秋からにできるのではないかと考えた。

¹⁵N-Gln, Tyr-D₄, 標識タンパク質やフラビンの ¹⁵N, ¹³C 標識体の再構成試料の同位体を網羅的に調製し、それらの FTIR 計測と、QM/MM 法による計算を駆使した結果、グルタミン近傍のトリプトファン残基 (図中には示さず) の水素結合の関与の有無が FTIR シグナルに大きな影響を与えることが示され、これが先行研究で用いていた BLUF ドメインと我々が計測した BLUF ドメインのスペクトルの形が大きく異なる原因であることが示された。また、先行研究では特定されなかったグルタミン側鎖の回転異性体構造 (図 2c, d) を明らかにすることができた。(5.雑誌論文 1)

- (2) 我々は BLUF ドメインの赤外線領域の 3000–2000 cm⁻¹ 領域にシグナルを見出したので、それ以前に研究対象としていた LOV ドメインの FTIR スペクトルを見直した。その結果、2800 cm⁻¹ にシグナルを見つけ、これを帰属することにより LOV ドメインの特殊な水素結合についての知見が得られると考えた。

同位体標識により、このシグナルがフラビンの N-H 基に由来することが明らかとなった。フラビンには 2 つの C=O 基と 1 つの N-H 基がタンパク質と水素結合により相互作用している。2800 cm⁻¹ というのは N-H 伸縮振動としては極めて低振動数であり、非常に強い水素結合を形成していることを意味する。これはバクテリオロドプシンにおいて塩橋を形成しているプロトン化シッフ塩基の N-H 基とカルボン酸の CO₂ における N-H 伸縮振動と同程度である。LOV ドメインのフラビン周囲には負電荷を持ったアミノ酸残基は存在しないにもかかわらずこのような低波数に現れることは驚くべきことである。この N-H 基が低波数に現れることは、数種類の LOV ドメイン及びその変異体について計測を行ったが、すべてに当てはまるものであった。LOV ドメイン一般の性質であることを強く示唆している。フラビンの N-H 伸縮振動は中間体でも強い水素結合を形成したままであったが、それはタンパク質骨格の変化を反映した水素結合強度の変化を示した。フラビンの N-H 基と水素結合を形成しているタンパク質骨格の β シート部分の構造変化と密接に関連している。また、LOV ドメインの構造変化の出力先として、phot1-LOV2 という種類では、Jα ヘリックスと呼ばれる LOV ドメインの C 末端側に結合している α ヘリックスに、phot2-LOV2 では Jα ヘリックスとベータシート、neol-LOV2 ではベータシートであることを以前に報告したが、フラビンの N-H 基の構造変化 LOV ドメインの種類にかかわらず類似していることが分かった。(5.雑誌論文 2)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. [Iwata, T.](#), Nagai, T., Ito, S., Osoegawa, S., Iseki, M., Watanabe, Unno, M., M., Kitagawa, S., and Kandori, H (2018) “Hydrogen Bonding Environments in the Photocycle Process around the Flavin Chromophore of the AppA-BLUF domain”, *Journal of the American Chemical Society* **140**, 11982–11991. DOI: 10.1021/jacs.8b05123 (査読あり)
2. [Iwata, T.](#), Nozaki, D., Yamamoto, A., Koyama, T., Nishina, Ya., Shiga, K., Tokutomi, S., Unno, M., and Kandori, H (2017) “Hydrogen Bonding Environment of the N3-H Group of Flavin Mononucleotide in the Light Oxygen Voltage Domains of Phototropins”, *Biochemistry* **56**, 3099–3108. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00057 (査読あり)

[学会発表] (計 1 3 件)

1. ○酒井結衣、山田大智、伊藤奨太、[岩田達也](#)、神取秀樹
「PHR/CRY ファミリーにおける FAD 酸化還元状態の制御メカニズムの解析」
日本生物物理学会中部支部講演会
2017 年 03 月 06 日
2. [Iwata, T.](#)
“How are flavoproteins "soft" for exhibiting intended functions?”
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
2016 年 11 月 25 日
3. ○Ueda, N., Ono, Y., [Iwata, T.](#), Iwaki, M., and Kandori, H.
“Artificial photosynthesis based on the engineered flavoprotein LOV”

- The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日
4. ○Kurahashi, Y., Wijaya, I M. M., Iwata, T., and Kandori, H.
“FTIR spectroscopic analysis of a DNAzyme possessing DNA photorepair activity”
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日
 5. ○Nagai, T., Iwata, T., Ito, S., Iseki, M., Watanabe, Unno, M., M., Kitagawa, S., and Kandori, H.
“Analysis of a hydrogen bonding network of the BLUF domain using isotope-labeled samples”
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日
 6. ○Kumagai, M., Yamada, D., Iwata, T., Yamamoto, J., Getzoff, E. D., Iwai, S. and Kandori, H.
Comparative FTIR study of photoactivation and photorepair of T(6-4)T and T(6-4)C photoproducts
by *Xenopus* (6-4) photolyase
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日
 7. ○Ito, S., Abe-Yoshizumi, R., Sugita, S., Inoue, K., Iwata, T., Iwaki, M. and Kandori, H.
FTIR study of sodium binding and photoreaction in KR2
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日
 8. ○Iwata, T., M. Hayakawa, and Kandori, H.
“Photochemical properties of DNA-bound flavin”
The 43rd international symposium on Nucleic Acids chemistry
2016年09月27日
 9. ○Kurahashi, Y., Wijaya, I M. M., Iwata, T. and Kandori, H.
Structural analysis of DNAzyme possessing DNA photolyase activity by FTIR spectroscopy
The 43rd international symposium on Nucleic Acids chemistry
2016年09月27日
 10. Iwata, T.
“How can a neutral semiquinone radical of flavin be stably formed in DNA photolyase?”
The 4th Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and
Materials Science Oriented Applications (国際学会招待講演)
2016年06月19日
 11. ○Y. Kurahashi;I M. M. Wijaya, Iwata, T., and Kandori, H.
Infrared spectrum analysis of a DNAzyme that functions as photorepair of UV- induced DNA
The 4th Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and
Materials Science Oriented Applications(国際学会)
2016年06月19日
 12. ○Kumagai, M., Yamada, D., Iwata, T., Yamamoto, J., Getzoff, E. D., Iwai, S., and Kandori, H.
“Comparison of photoactivation and photorepair of T(6-4)T and T(6-4)C photoproducts by *Xenopus*
(6-4) photolyase on FTIR study”
American Society for Photobiology Conference (国際学会)
2016年05月21日
 13. ○Ueda, N., Ono, Y., Iwata, T., Iwaki, M., and Kandori, H.
“Artificial photosynthesis with a single redox centre based on the engineered flavoprotein LOV”
American Society for Photobiology Conference (国際学会)
2016年05月21日

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

[5 雑誌論文 1]に関するプレスリリース

https://www.toho-u.ac.jp/press/2018_index/20180914-909.html

[5 雑誌論文 1]に関する紹介記事

https://www.nikkei.com/article/DGXLRS490552_U8A910C100000/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当者無し

(2) 研究協力者

該当者無し

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。