

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究(G)

研究期間：2007-2008

課題番号：19570154

研究課題名（和文） 短鎖青色光受容体タンパク質の光受容と構造変化

研究課題名（英文） The relationship between photoreception and structure change of the short BLUF (the sensor of Blue Light Using FAD) protein

研究代表者

喜田 昭子 (KITA AKIKO)

京都大学・原子炉実験所・助教

研究者番号：70273430

研究成果の概要：

生物の青光受容体の一つとして BLUF タンパク質がある。BLUF タンパク質は、青色光受容時に立体構造を変化させてシグナルを伝達すると考えられている。

青色光受容時の BLUF タンパク質の構造変化について知見を得ることを目的として構造生物学的研究を行った。青色光照射下での X 線回折実験、結晶化、結晶の経時変化観察を通して、青色光が BLUF タンパク質に与える影響について考察した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：短鎖青色光受容体, BLUF, PixD, FAD, 構造変化, X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

多くの生物にとって、光はエネルギーを得るための源であるだけでなく、代謝や発生・行動など生体内反応を制御するための信号としての役割も果たしている。そのため、生物は多種多様な光受容システムを発達させている。光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* 由来の AppA タンパク質の N 末端領域が青色光を受容し、光合成遺伝子発現の制御をしていることが明らかになった (S. Masuda & C. Bauer, *Cell*, 110, 613-623

(2002))。この領域は、アミノ酸残基数約 100 からなり、補欠因子として FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を含んでいることが特徴であることから、BLUF (sensor of Blue Light Using FAD) と呼ばれる。ゲノム解析により現在では、この BLUF 領域はラン色細菌をはじめ、多くの生物種に広く存在することが明らかになっている (M. Gomelsky & G. Klug, *Trends Biochem. Sci.* 27, 497-500 (2002))。BLUF タンパク質は、BLUF ドメインと複数の大きなタンパク質ドメインからな

るマルチドメイン型と、BLUF ドメインの C 末端に数十アミノ酸残基からなる C 末端ドメインが繋がった短鎖型の 2 種類に分類でき、前述の AppA はマルチドメイン型である。BLUF ドメインは生物種や型によらずアミノ酸残基の相同性があるが、同じ青色光受容体であるフォトトロピンやクリプトクロムとの間にアミノ酸残基の相同性が全く無いことから、それらとは全く違う光受容機構をもつと考えられている。

筆者らは、好熱性ラン色細菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来の短鎖型 BLUF タンパク質 PixD の全長構造を、BLUF タンパク質として初めて、X 線結晶構造解析の手法により明らかにした (A. Kita, et al., *J. Mol. Biol.*, 349, 1-9 (2005), PDB code: 1x0p)。PixD はアミノ酸残基数 143 から成る単量体が、五回回転軸をもつ環状構造を作り、それが 2 つ重なった大きな十量体構造をとっている。PixD 単量体は FAD を含む BLUF ドメインと、ヘリックスからなる C 末端ドメインから構成される。BLUF ドメインは環状構造の外側に位置し、FAD は、最も外側にある 2 本のヘリックスの間で固定されている。筆者らは結晶化および X 線回折実験に際して青色光照射は行わなかったため、この構造は PixD が光受容反応による励起状態にはない、「暗状態」を反映していると考えられる。

BLUF タンパク質の FAD は、青色光受容により水素結合状態を変化させ、暗状態から明状態へ変化し、再び暗状態に戻るといった光受容サイクルを繰り返すと考えられている。そして、光受容に伴う FAD の周辺の水素結合の状態変化は BLUF タンパク質の立体構造変化と対応していると考えられており、明状態の BLUF タンパク質の立体構造に興味を持たれている。しかし一般には BLUF タンパク質に光照射を行うと光受容サイクルが起こり、明暗平衡状態になるため、明状態だけの構造を解明するのは困難である。

PixD は、極低温 (液体窒素温度) 下で青色光照射を行った場合に、明状態から暗状態に戻る際の間状態である F 状態で、液体ヘリウム温度では F 状態とは違う I 状態で止まることが示されている (K. Okajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, A. Kita et al., *J. Mol. Biol.*, 363, 10-18 (2006))。この現象を利用して、光受容サイクルの中間体構造を捕らえることができる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、PixD を標品として、BLUF タン

パク質の光受容サイクル中間体構造を X 線結晶解析の手法で明らかにし、その光受容サイクルを原子レベルで解明することが目的である。筆者らは、分光学的実験により結晶内でも光受容反応が起こること、低温 X 線回折実験により青色光照射状態の PixD 結晶の格子定数が暗状態より変化することを確認した。本研究では、F、または I 状態の PixD 立体構造から、光受容サイクルに伴う PixD の構造変化を明らかにすることを目標とする。並行して、結晶への青色光照射では結晶格子の制限を受けて本来の構造変化が妨げられている可能性を考え、青色光照射下での結晶化と構造解析を計画した。これらの実験で得られた立体構造から、光受容機構について情報を得ることを目標とした。

3. 研究の方法

以下の 2 通りの結晶調整と X 線回折実験を計画した。

A. 通常の結晶化を行い、放射光施設において結晶へ青色光を照射して X 線回折実験を行う。

B. 青色光照射下での結晶化を行い (図 1)、そのまま実験室系 X 線発生装置で X 線回折実験を行う。強度データ収集可能な結晶を、液体窒素を用いて冷却・凍結し、放射光施設での回折実験に共ずる。

結晶の取り扱いは暗室において行い、顕微鏡下での結晶の選択や結晶の装置へのマウントに必要な光は赤セロハンを透過した光を利用した。青色光には青色 LED を用いた。また、高分解能の反射強度データ収集を行うために、X 線回折実験は放射光実験施設で行った。



図 1

4. 研究成果

(1) 通常の結晶化

結晶化は従来の結晶化方法の通り、結晶化試薬として PEG400 を使用することで得ることが出来た。しかし、青色光照射下で X 線回折実験を行ったところ、得られたほとんどの結晶が多結晶性反射を示した。また、従来の結晶が 2Å 分解能の反射を呈したのに対し、本研究で得られた結晶は 3Å 分解能を超える反射を呈するものは少なかった。本研究では、アミノ酸側鎖の構造変化を検出する必要があり、高分解能の反射強度データ収集が必要

である。そのため、単結晶を得ることを目的として

- ・従来結晶化条件の再最適化
 - ・バッチ法での結晶化
 - ・新しい結晶化条件の探索
- から研究をスタートした。

①. 従来結晶化条件の再最適化

従来の結晶化条件で使用してきた緩衝溶液以外に数種の緩衝溶液を用いて、pHを3.5～5.0の範囲で最適化を試み、それぞれについてX線回折実験を行ったが、多結晶性の傾向は改善されなかった。また低温での結晶化も行ったが、得られた結晶の回折実験を行ったところ、多結晶性が増すという結果になった。

②. バッチ法での結晶化

従来の結晶化は蒸気拡散法で行っていたが、より穏やかな条件での結晶化条件を探し、結晶化試薬としてPEG400を用いたバッチ法での結晶化を行った。その結果、粒状結晶が24時間程度で得られた(図2)。しかし、実験室系X線発生装置でX線回折実験を行ったところ分解能が8Å以下と低く反射も著しく伸びていたため、その後の反射強度データ収集には用いることを断念した。

③. 新しい結晶化条件の探索

従来の結晶化条件での結晶化でデータ収集可能な結晶が得られる確率が低いため、新たに結晶化条件の探索を行った。Isopropanolを主たる沈殿剤として使用する条件において結晶を得ることができた(図3)が、この結晶はバッチ開封時にバッチ内に生じる対流のために取り扱いが難しい上、反射の質・分解能ともにPEG400由来結晶を上回ることにはなかった(シンクロトロン放射光を用いた場合であっても最高分解能3.4Å)ため、その後の反射強度データ収集に用いることを断念した。

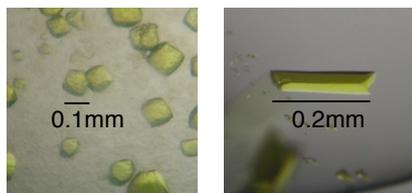


図2

図3

(2) 青色光照射下でのX線回折実験

(1)で得られた結晶に青色光を照射し、光受容時における構造変化の可視化を試み

た。放射光実験施設において、ビームラインでの青色光照射とその回折実験を多数回行った。結晶は100Kに冷却して回折実験を行うが、結晶への青色光照射は、冷却後に照射する方法(図4・方法1)と、冷却前から照射する方法(図4・方法2)の2通りを行った。

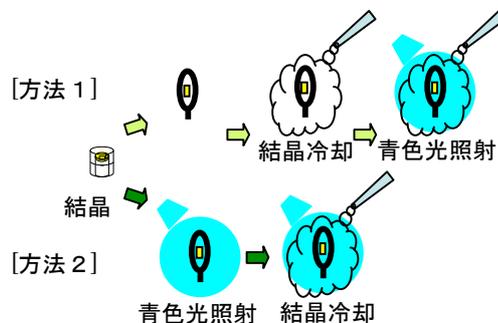


図4. 結晶への青色光照射と冷却方法

殆どが多結晶性の反射を呈する中、いくつかの結晶で反射強度データを収集することができた。以下に、反射強度データ収集ができたものについて示す。溶液を用いた分光学的実験では、明状態を作り出す際に青色光を照射するインターバルを5分間としている。そこで、本研究においてもBLUFは5分間青色光を遮光することで暗状態に戻ると考えて実験を行っている。

・従来型結晶(暗状態結晶)：

室内は点灯したまま結晶冷却し、データ収集を行った。(室内灯は青色光照射ではないため、(従来型・PDB Code 1x0p)と同じであると判断している。)2.5Å分解能のデータを収集した。

・青色光照射結晶：

従来型結晶の反射強度データ収集後、同じ結晶に引き続き青色光を3分間照射し、その後青色光を消灯してから、反射強度データ収集を行った。(図4・方法1に相当)2.6Å分解能のデータを収集した。

・暗状態結晶：

暗室において結晶を静置し、約5分経過後に結晶を冷却・マウントし、そのまま反射強度データを収集した。2.7Å分解能のデータを収集した。

・青色光照射結晶2：

暗状態結晶に、(同じ結晶に)引き続き青色光を3分間照射してデータ収集を行った。(図4・方法1に相当)2.8Å分解能のデータ

を収集した。

・青色光照射結晶 3 :

結晶を低温気流下にマウントする以前より青色光を照射，青色光照射下で結晶冷却および回折実験を行った(図4・方法2に相当)． 2.9\AA 分解能のデータを収集した。

・長時間青色光照射結晶 :

室内は点灯したまま青色光照射下で結晶を冷却・マウントし，部屋を消灯，そのまま40分間青色光照射を続け，その後青色光を消灯して反射強度データを収集した．(図4・方法2に相当) 2.3\AA 分解能のデータを収集した。

結果：上記全ての結晶について，回折強度データを処理し，構造解析を行った．得られた構造をもとに，青色光照射により最も顕著に構造変化が観測できるであろう FAD の周囲を中心に構造比較を行った．実験では，従来の立体構造(PDB code: 1x0p)の状態が暗状態ではない場合を考慮し，暗状態を作り出してのデータ収集・構造解析も行った(上記暗状態結晶)．その結果，本研究で構造解析した暗状態結晶と 1x0p との差異を見いだすことは出来なかった．また，青色光照射を行ったいずれの結晶構造も従来型(および暗状態型)の構造からの変化を見いだすことはできなかった．この結果より，青色光照射下での結晶内分子では，アミノ酸側鎖の向きが変化するなどの比較的大きな構造変化ではなく，電子状態や結合距離などの微量な変化が起こっていると考えられる。

(3) 青色光照射下での結晶化

結晶への青色光照射の効果が可視化できなかったため，図1の装置を用いて青色光照射下での結晶化を試みた．その結果，青色光を照射した結晶化バッチは一日で薄く白濁し，結晶を得ることは出来なかった(図5)．対照実験として，同じ条件で遮光した結晶化バッチからは24時間で結晶が析出したため，長時間の青色光照射が，結晶化時の分子間接触を妨げる構造変化を誘起したか，またはタンパク質そのものを変性させた可能性がある。

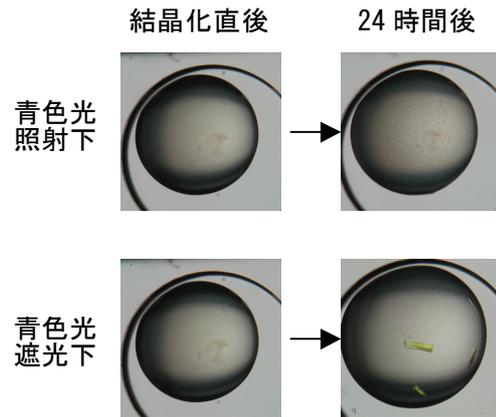


図5. 青色光照射下での結晶化

(4) 青色光照射下での結晶の変化

PixD 結晶に青色光を長時間照射し，結晶を観察した(図6)．結晶は PEG400, isopropanol 由来の各結晶を用いた．青色光照射は図1の装置を使用した．いずれも約1日後から結晶表面が徐々に崩れ出し，結晶のエッジが消失していくことが観測された．また9日間で完全に透過性を失い，結晶は鮮やかな黄色から茶色い沈殿様集合体へ変化していることが観測された．これより，青色光照射が結晶を壊す，つまり分子間接触を妨げる様な作用をしている可能性があるのと同時に，タンパク質を変性させた可能性があると考えられる。



図6. 青色光照射下での結晶の変化
(写真は isopropanol 由来結晶)

(5) まとめ

X線結晶構造解析の手法を用いて青色光照射による構造変化を捉えようとしたが，反射強度データ収集ができた結晶の結晶構造からはアミノ酸側鎖などの構造に光照射前後での差異を見いだすことはできなかった．また，青色光照射下では結晶が析出しない現象，および長時間の青色光連続照射により BLUF 結晶が壊れていく現象を確認することが出来た．これらの現象は，青色光照射が結晶内の分子間接触を妨げる様な作用をする，またはタンパク質を変性させる，という両可能性が有ることを示している．PixD は負の走光性に関与するタンパク質であるが，この性質と

長時間青色光照射により結晶が壊れていく現象とが関連しているのかどうかは不明である。また、結晶に光照射を行う今回採用した方法では、青色光照射による構造変化は検出が難しいということが判明した。BLUFの光受容機構を探るためには、別のアプローチを検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

1. 喜田昭子, 「青色光受容体 BLUF タンパク質の構造生物学的研究」, 京都大学原子炉実験所第 43 回学術講演会, 2009 年 1 月 22 日, 京都大学原子炉実験所

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜田 昭子 (KITA AKIKO)

京都大学・原子炉実験所・助教

研究者番号: 70273430